

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**Novos Inibidores de AChE com Propriedades  
Antioxidantes, como Potenciais  
Anti-neurodegenerativos.  
Design, Síntese, Avaliação Físico-química e  
Biológica**

**Ivan Dário Monteiro Sabino**

Dissertação  
Mestrado em Bioquímica  
Especialização em Bioquímica

**2014**

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**Novos Inibidores de AChE com Propriedades  
Antioxidantes, como Potenciais  
Anti-neurodegenerativos.  
Design, Síntese, Avaliação Físico-química e  
Biológica**

**Ivan Dário Monteiro Sabino**

Dissertação  
Mestrado em Bioquímica  
Especialização em Bioquímica

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro

Professora Doutora Maria Amélia Loureiro Dos Santos Seabra

## **Agradecimentos**

Agradeço à professora Maria Luísa Serralheiro por ter aceitado ser minha orientadora, aquando do estágio. Obrigado pela sua compreensão, ensinamentos, paciência, disponibilidade nesta dura e longa batalha que foi a escrita desta tese.

À professora Maria Amélia Seabra por ter aceitado ser minha orientadora e disponibilizado o laboratório onde decorreu grande parte do trabalho prática. Mostrou-se sempre disponível, atenciosa, compreensiva e acima de tudo teve a paciência necessária para que conseguisse alcançar os meus objectivos.

Ao Doutor Sérgio Marques pelo seu inestimável apoio no laboratório ao longo de quase 12 meses. Pela sua boa disposição, perseverança, valiosíssimos ensinamentos transmitidos, em particular na síntese e modelação molecular.

À Claudia Abate pela sua simpatia, amizade, companheirismo e pelas conversas agradáveis de inverno mantidas no laboratório....Grazzie Clá...

Aos meus colegas de laboratório pelo óptimo ambiente proporcionado no laboratório e amizade

Aos meus amigos e colegas de faculdade pela vivência, companheirismo e amizade....

Por último, mas não menos importante. Aos meus estimados e queridos pais, irmãos, e restante família pelo apoio, suporte emocional ao longo destes anos de estudo e em especial na escrita desta tese.

Um bem-haja à todos

## Resumo

Com o objectivo de encontrar nova terapia inovadora contra a doença de Alzheimer (DA), este projecto centrou-se no desenvolvimento e estudo de novos compostos bi-funcionais com propriedades de anti-acetilcolinesterase e antioxidantes. No design dos novos compostos, o fármaco donepezil foi usado como modelo estrutural de forma a promover naqueles a interação com o centro activo do acetilcolinesterase (AChE). Assim, optou-se por incluir um grupo derivado do ácido cafeico, o qual pode conferir propriedades antioxidantes, e um grupo benzotiazole, para promover a capacidade de reconhecimento do péptido  $\beta$ -amilóide. Estes dois grupos funcionais foram ligados entre si através de um espaçador, geralmente derivado de um aminácido. Através de programas de modelação molecular, desenharam-se os compostos alvo, fazendo o docking AChE–ligando de modo a prever *in silico* as interacções estabelecidas pelas moléculas candidatas com aquela enzima. Os compostos mais promissores foram sintetizados, e foram posteriormente avaliados relativamente à sua capacidade inibitória do AChE. Foram observadas actividades na gama micromolar, com valores de  $IC_{50}$  entre 163 e 11.7  $\mu$ M, tendo o composto 9, com um espaçador aromático, apresentado os melhores resultados. Estudou-se ainda a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados, verificando-se que os compostos mono-metilados na posição meta do grupo cafeico (matendo livre o grupo para-hidroxilo) são *scavengers* de radicais livres mais eficientes do que os dimetilados, logo com maior poder antioxidante. Os resultados mostraram o composto 9 como sendo o mais antioxidante, com  $EC_{50}$  de 41.4  $\mu$ M. Em suma, pode concluir-se ter sido desenvolvida uma estratégia inovadora na procura de compostos bi-funcionais com propriedades que visam bloquear duas vias independentes que contribuem para a fisiopatologia da DA. Alguns dos novos inibidores, preparados através de uma estratégia sintética simples, de dois passos, demonstraram possuir as propriedades desejadas, sendo por isso novos compostos-líder com potencial no desenvolvimento de futuras drogas contra aquela patologia.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer, Acetilcolinesterase, Donepezil, Docking, inibidores de AChE, Capacidade antioxidante

## Abstract

Aiming at finding new innovative therapies against Alzheimer's disease (AD), this project was focused on the development and study of new bi-functional compounds with antiacetylcholinesterase and antioxidant properties. For designing the new compounds, the drug donepezil has been used as a structural model, in order to ensure their ability to interact with the acetylcholinesterase (AChE) active site. Hence, we have decided to include a group deriving from the caffeic acid, which has antioxidant properties, and a benzothiazole group, thus promoting their ability for recognizing  $\beta$ -amyloid peptides. These two functional groups were linked through a spacer, usually derived from an amino acid. The target compounds were designed with the aid of molecular modeling tools, by performing the AChE–ligand docking, in order to predict *in silico* the interactions formed by the candidates with the enzyme. The most promising compounds have been synthesized, and then evaluated on their ability to inhibit AChE. These studies have shown activities in micromolar range, with  $IC_{50}$  values between 163 and 11.7  $\mu$ M; compound **9**, having an aromatic spacer, presented the best result. The antioxidant activity of these compounds has also been evaluated. It was observed that the mono-methylated compounds at the *meta*-position of the caffeic moiety (keeping free the *para*-hydroxyl group) are more efficient free radical scavengers than the di-methylated ones, thus being more potent antioxidants. These results have shown compound **9** as the most antioxidant among all tested, with  $EC_{50}$  value of 41.4  $\mu$ M. In summary, it can be concluded that a new innovative strategy has been developed, seeking for bi-functional compounds with properties targeting two independent pathways towards AD. Some of the new inhibitors, prepared by a two-step synthetic strategy, have demonstrated some of the sought properties, and this makes them new lead compounds, with potential in the future development of drugs against that pathology.

Keywords: Alzheimer's Disease, Acetylcholinesterase, AChE-inhibitors, Docking

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	I
RESUMO .....	IV
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS E TABELAS .....	- 1 -
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	1
1.1. Introdução.....	3
1.2. Química medicinal e a inibição enzimática.....	3
1.3. Doenças neurodegenerativas – O mal da era moderna.....	4
1.4. A doença de Alzheimer (DA).....	5
1.5. Hipótese Colinérgica .....	6
1.6. Hipótese Amilóide e a proteína APP .....	7
1.6.1. Hiperfosforilação da proteína tau ( $\tau$ ) .....	8
1.6.2. Stress oxidativo.....	9
1.7. Acetilcolinesterase (AChE) – estrutura e função .....	10
1.7.1. Generalidades sobre o AChE.....	10
1.7.2. Estrutura do AChE de torpedo califórnica (TcAChE).....	10
1.7.3. Mecanismo catalítico do AChE .....	13
1.8. Tratamento da Doença de Alzheimer .....	15
1.8.1. Inibidores do acetilcolinesterase .....	15

2. Resultados e discussão .....	19
2.1. Design dos inibidores .....	19
2.2. Conjunto de inibidores preparados e intermediários .....	22
2.3. Estratégias de síntese .....	24
2.4. Mecanismo de síntese dos derivados benzotiazole.....	26
2.5. Síntese dos compostos finais (2-6) utilizando EDCI como agente de acoplamento 27	
2.6. Síntese dos compostos (1, 7-9) utilizando TBTU como agente de acoplamento	28
Estudos de inibição enzimática e da capacidade antioxidante .....	29
2.7. ....	29
2.7.1. Inibição do acetilcolinesterase (AChE) .....	29
2.7.2. Considerações sobre o método e substratos usados.....	29
2.7.3. Resultados de inibição enzimática.....	32
2.8. Estudos da capacidade antioxidante .....	36
2.8.1. Considerações sobre o método e substratos usados.....	36
2.8.2. Resultados da capacidade antioxidante.....	37
2.9. Modelação molecular .....	40
2.10. Propriedades farmacocinéticas .....	44
2.11. Conclusões.....	45
3. Parte experimental .....	47
3.1. Modelação molecular .....	47

3.2.	Previsão das propriedades farmacocinéticas .....	48
3.3.	Síntese dos compostos .....	49
3.3.1.	Reagentes e instrumentação .....	49
3.3.2.	Síntese dos derivados benzotiazole dos aminoácidos .....	50
3.3.2.1.	2 - (Benzotiazol-2-il)metil-etanamina (1a) .....	50
3.3.2.2.	2-(Benzotiazol-2-il)etanamina (2a).....	50
3.3.2.3.	(S)-1-benzotiazol-2-il)etanamina (3a) .....	50
3.3.2.4.	(R)-1-(Benzotiazol-2-il)etanamina (4a) .....	51
3.3.2.5.	(S)-1- (Benzotiazol-2-il)-2-metilpropano-1-amina (5a) .....	51
3.3.2.6.	4-(Benzotiazol-2-ilmetil)anilina (6a) .....	51
3.3.3.	Síntese dos compostos alvo (1–9).....	52
3.3.3.1.	(E)-N-(benzo[d]tiazol-2-il-metil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (1).....	52
3.3.3.2.	(E)-N-(2-benzo[d]tiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (2).....	52
3.3.3.3.	(S,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (3) .....	53
3.3.3.4.	(R,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (4).....	53
3.3.3.5.	(R,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)-2-metilpropil)-3-(3,4-dimetoxifenil)      acrilamida (5)                      54	
3.3.3.6.	(E)-N-(4-(benzothiazol-2-il-metil)fenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-acrilamida (6)54	
3.3.3.7.	(E)-N-(2-benzotiazol-2-il)etil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (7) .....	55
3.3.3.8.	(S,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acrilamida (8) .	55
3.3.3.9.	(E)-N-(4-benzotiazol-2-il-metil)fenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)      acrilamida (9)                      56	



3.4.	Ensaio de inibição enzimática.....	56
3.5.	Estudo da capacidade antioxidante.....	57
	Bibliografia.....	59

## Índice de Figuras, Esquemas e Tabelas

Figura 1: Representação esquemática na natureza multifactorial das doenças neurodegenerativas. O misfolding proteico, o stresse oxidativo e a desregulação da homeostase dos metais foram identificados em muitas patologias cerebrais <sup>5</sup> .....	5
Figura 2. Representação esquemática da estrutura secundária do enzima, TcAChE. As hélices $\alpha$ estão representadas pelos cilindros a vermelho, enquanto as folhas $\beta$ pelas setas a azul. Os resíduos de aminoácidos que fazem parte do centro activo estão a verde <sup>16,60</sup> .....	11
Figura 3: Representação esquemática da garganta catalítica do TcAChE, onde se evidenciam o CAS (Trp 84, Phe330) e o PAS (Trp 279, Tyr70), bem como a tríade catalítica na base (S200, H440, E327). <sup>28</sup> .....	12
Figura 4: Estrutura tridimensional do acetilcolinesterase de <i>torpedo californica</i> , TcAChE. Os 14 resíduos aromáticos estão representados pela superfície rosa. A zona de ligação da acetilcolina encontra-se na base da garganta. <sup>62</sup> .....	13
Figura 5: Ilustração do complexo formado entre o centro activo do enzima e a acetilcolina (a) – representação da estrutura do centro activo; (b) – resíduos envolvidos na catálise enzimática. <sup>64</sup> .....	14
Figura 6: Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pelo AChE e respectiva regeneração do enzima. <sup>64</sup> .....	14
Figura 7: Mecanismo de actuação dos inibidores dos colinesterases no sistema colinérgico. O ACh é libertado na fenda sináptica onde activa os receptores pós-sinápticos e pré-sinápticos (nicotínicos e muscarínicos) levando ao aumento da transmissão colinérgica, sendo depois hidrolisado pelo AChE, que é o alvo dos inibidores no tratamento paliativo da AD. <sup>38</sup> .....	16
Figura 8: Estruturas químicas dos inibidores dos colinesterases de primeira e segunda geração.....	17
Figura 9: Gráficos de absorvência a 405 nm (Abs405nm) em função do tempo (min), em experiências de hidrólise do substrato, iodeto de acetiltiocolina, catalisada pelo	

acetilcolinesterase (AChE), na ausência (0 $\mu$ M) e na presença do composto 3 como inibidor (16 – 100 $\mu$ M) .....	31
Figura 10: Estruturas químicas do radical estável (1) e da forma reduzida (2) do DPPH. A azul destaca-se o grupo picril que confere a cor amarela á forma reduzida .....	37
Figura 11: Gráfico da percentagem de extinção do radical estável do DPPH em função da concentração do composto 9, e respectivas retas de regressão linear.....	38
Figura 12: Resultado de <i>docking</i> do composto 1 (laranja) no AChE, sobreposto com o Dnp (magenta) na sua posição original (a); a superfície de malha (b) representa um corte transversal na garganta catalítica, sendo as regiões azuis hidrófilas, e as vermelhas hidrófobas. Fazem parte da tríade catalítica os resíduos S200, E327, H440; do CAS os resíduos W84, F330, E199; do PAS os resíduos Y70, D72, W279 .....	41
Figura 13: Resultados de <i>docking</i> do composto 1 (laranja) no AChE, sobreposto com 2 (verde) (a), e com 3 (verde escuro) e 4 (ciano) (b).....	42
Figura 14: Resultados de <i>docking</i> de 6 (rosa) no AChE, sobreposto com 1 (laranja) (a), e 9 (azul) (b); superfícies azuis representam zonas hidrófilas do enzima, e vermelhas zonas hidrófobas.....	43
Esquema 2: Estrutura geral dos inibidores do AChE desenvolvidos. BTA-AA - Derivado benzotiazole do 2-aminotiofenol ligado a um resíduo de aminoácido (espaçador), com hipotética afinidade para o PAS do enzima e para o péptido $\beta$ -amilóide. DMCA - ácido dimetoxicinâmico, análogo estrutural do donepezil, com afinidade para o centro activo do enzima .....	20
Esquema 3: Estrutura química do fármaco donepezil para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer. À vermelho destaca-se a parte da molécula que serviu de modelo aos novos inibidores desenvolvidos neste trabalho .....	21
Esquema 4: Estruturas dos compostos desenhados e sintetizados (1 – 9), seguindo a estrutura geral descrita anteriormente (ver esquema 2).....	23
Esquema 5: Esquema geral para a síntese dos compostos alvos. Reagentes e condições: i) ácido polifosfórico (PPA), 220 °C; ii) ácido dimetoxicinâmico ( $R_1=R_2=CH_3$ ) ou ácido	

ferúlico ( $R_1=H$ , $R_2=CH_3$ ), EDCI/DMAP cat., T.amb; iii) ácido dimetoxicinâmico ( $R_1=R_2=CH_3$ ) ou ácido ferúlico ( $R_1=H$ , $R_2=CH_3$ ), TBTU/NMM, 0 °C.....	24
Esquema 7: Estrutura química dos derivados do ácido cafeico (2b, 3b) e ácido cafeico (3b) .....	25
Pode observar-se a analogia estrutural entre o grupo dimetoxibenzeno (a vermelho) dos derivados do ácido cafeico (esquema 7) e o mesmo grupo donepezil (esquema 3).....	25
Esquema 8: Reacção geral de síntese do derivado benzotiazole do aminoácido ou espaçador .....	26
Esquema 9: Mecanismo de reacção geral da síntese do derivado benzotiazole (BTA). O grupo $R_1$ representa possíveis grupos laterais dos aminoácidos.....	26
Esquema 10: Mecanismo da reacção geral de acoplamento de uma amina $NH_2R'$ a um ácido carboxílico usando EDCI como agente de acoplamento. Os substituintes $R_2$ e $R_3$ podem ser H e/ou $CH_3$ respectivamente. O grupo X é o espaçador e o $R_1$ grupo lateral do AA .....	27
Esquema 11: Mecanismo da reacção geral de acoplamento de uma amina $NH_2R'$ a um ácido carboxílico usando TBTU como agente de acoplamento. De realçar que, para os compostos 7-9 o substituinte $R_3$ é um átomo de hidrogénio .....	28
Esquema 12: Descrição geral do método de Ellman para a determinação da actividade dos colinesteresas (neste caso AChE). .....	30

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

Ala- Alanina

Abs – Absorvência

A $\beta$  –  $\beta$ -amilóide

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

AChI – Iodeto de Acetilcolina

AD – Doença de Alzheimer

ADCMA – Ácido dimetoxicinâmico

APA – Aminofenilacético

APP – Proteína Percursora Amilóide

BTA - Benzotiazole

BChE – Butirilcolinesterase

CAS – Centro Aniônico Catalítico (sigla em inglês)

CNS – Sistema Nervoso Central

DCM – Diclorometano

DMF – Dimetilformamida

DMAP –Di-aminopiridina

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DTNB – Ácido 5,5'-ditios- (2-nitrobenzóico)

EDCI - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida

EtOAc – Acetato de etilo

ESI - Ionização por electrospray

E327 – Resíduo de glutamato

HEPES – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil] etano sulfônico

His – Histidina

H – hora

IACHe – Inibidor de AChE

IC<sub>50</sub> – concentração a que corresponde 50% de inibição

Lis - Lisina

MeOH – Metanol

min – minuto

mM – milimolar

μM – micromolar

nM – nanomolar

NMM – N-metilmorfolina

PAS – Centro aniónico periférico

Phe – Fenilalanina

RMN – Ressonância magnética nuclear

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

S – segundo

τ – tau

TBTU - *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio

TcAChE – Acetilcolinesterase de Torpedo Califórnica

TMS – Trimetilsilano

Trp – Triptofano

Tyr –Tirosina

UV-VIS – Ultravioleta-Visível

## **1.1. Introdução**

### **1.2. Química medicinal e a inibição enzimática**

A química medicinal constitui actualmente uma ferramenta de grande utilidade para os investigadores das áreas ligadas à saúde. Representa a unificação de múltiplas áreas das ciências da saúde, como sendo a Bioquímica, a Genética Molecular, a Medicina, a Química, as Ciências Farmacêuticas, etc. Dada a sua extrema versatilidade, permite-nos estabelecer estratégias de I&D, com vista ao desenvolvimento de terapias para doenças, resultando num aumento da qualidade de vida das populações e da esperança média de vida das mesmas. Numa altura em que a temática da saúde ganha cada vez mais destaque no seio da comunidade científica e política, a procura por novas formas de tratamento e controlo de doenças é uma constante. Nesse sentido, tendo em conta a fisiologia dos seres vivos, em particular do ser humano, os sistemas enzimáticos e/ou receptores biológicos constituem um alvo principal da química medicinal e das suas áreas complementares. Em particular, os enzimas são importantes para a manutenção da vida, catalisando reacções em fracções de segundos com grande eficiência. Dada a sua especificidade, estas reacções levariam anos a ocorrer ou simplesmente não poderiam dar-se sem a presença de um catalisador biológico (enzima). O número de enzimas necessários à catálise das múltiplas reacções que ocorrem na célula a cada segundo é na ordem dos milhares em todo o corpo humano. Dada a quantidade de enzimas envolvidos na manutenção do funcionamento da célula, é de esperar que muitas situações patológicas tenham origem em falhas ou desregulação de sistemas enzimáticos ou receptores biológicos. Assim, não é de se estranhar que grande parte da investigação científica que se faz nos laboratórios académicos e nas empresas farmacêuticas tenha como foco principal a inibição enzimática e formas direccionadas de terapia. A informação funcional e estrutural que se tem dos enzimas, através da enzimologia, da difração de raios-X ou de outros métodos espectrométricos ou ainda de ferramentas computacionais é de extrema importância, já que, permite-nos desenvolver drogas/fármacos altamente potentes e específicos para àqueles. Os programas computacionais, como por exemplo, de simulação de interacções enzima-ligando (*docking*) constituem actualmente ferramentas de extrema precisão e importância na procura de novos inibidores de sistemas enzimáticos e no estudo de complexos proteína-ligando. O *design* de novos inibidores enzimáticos, tem em conta muitos pressupostos, como por exemplo, a massa molecular, o tipo de metabolismo, a

acessibilidade ao enzima e ao respectivo centro activo, o tipo de interacções que possa estabelecer com o centro activo do enzima, ou possíveis complementaridades com o substrato natural do enzima. No âmbito deste projecto, o objectivo foi o desenvolvimento de novos inibidores do enzima acetilcolinesterase (AChE), que está envolvido na etiologia da doença de Alzheimer.<sup>1,2</sup>

Pretende-se também que estes inibidores tenham alguma capacidade antioxidante, conferindo-lhes assim características bi-funcionais.

### **1.3. Doenças neurodegenerativas – O mal da era moderna**

Com o aumento das condições de vida das populações, a esperança média de vida acabou por aumentar consideravelmente nos últimos anos. Este facto fez com que novas doenças aparecessem à medida que os indivíduos envelhecem. Assim, as doenças neurodegenerativas (DN) começaram a ser uma constante na população contemporânea, nomeadamente na terceira idade. As DN são etiologicamente complexas, sendo os seus mecanismos bioquímicos pouco descritos integralmente.<sup>3</sup> São causados por diversos factores, como sendo genéticos, ambientais, endógenos, conferindo-lhes carácter multifactorial e em certa medida enigmático.<sup>16</sup>

As DN mais conhecidas são a Doença de Alzheimer (DA), Parkinson (PD), Huntington (HD) e Esclerose Lateral Múltipla (ELM), entre outros. Estas apresentam mecanismos de desenvolvimento extremamente complexos o que torna difícil o desenvolvimento de terapias ideais ou cem por cento eficientes.<sup>4</sup>

Embora tenha o seu próprio mecanismo molecular e manifestações clínicas específicas, algumas vias patológicas podem ser comuns a diferentes doenças neurodegenerativas, a exemplo de proteínas deformadas e consequente agregação, ver figura 1<sup>5</sup>. No caso das proteínas, muitas formas monoméricas pode organizar-se em estruturas fibrilares, causando consequências drásticas, características das doenças neurodegenerativas. Outro factor importante na DN, é o stresse oxidativo, dado o e consequente dano nas estruturas neuronais<sup>6</sup>. O seu efeito é ainda mais acentuado dado o baixo nível de antioxidantes no cérebro. Estudos relevam também que a desregulação do mitocôndrio está também relacionada com a interacção com proteínas amiloidóticas, como por exemplo, a APP na AD, a parkina na doença de Parkinson, etc.<sup>5,8</sup>



Assim, dado o carácter multifactorial das DN, é difícil prever cronologicamente os diversos eventos bioquímicos que se dão e inferir qual ou quais os factores que despoletam o seu aparecimento e desenvolvimento, bem como desenhar fármacos *multi-target* com vista à terapia.<sup>9,10,11,12</sup>

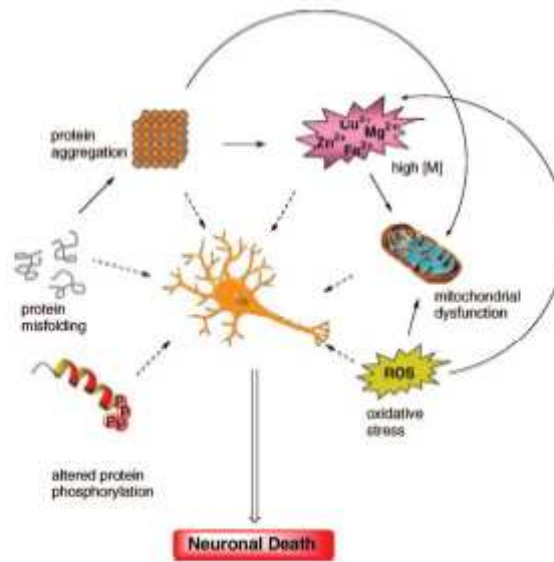


Figura 1: Representação esquemática na natureza multifactorial das doenças neurodegenerativas. O misfolding proteico, o stresse oxidativo e a desregulação da homeostase dos metais foram identificados em muitas patologias cerebrais<sup>5</sup>.

#### 1.4. A doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer ou também designada por doença senil do tipo Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum em indivíduos da terceira idade.<sup>13, 14</sup>

O termo Alzheimer que lhe dá nome foi introduzido pela primeira vez em 1906 pelo psiquiatra e neuropatologista alemão Alois Alzheimer. Descreveu manifestações clínicas e patológicas numa mulher de 51 anos, que apresentava problemas de concentração, memória, discernimento, desorientação, etc. Ao autopsiar indivíduos com problemas neuropsiquiátricos, observou placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares extracelulares no córtex cerebral<sup>15, 16</sup>. Mais de 100 anos depois a sua descoberta, ainda hoje está por elucidar na sua totalidade a etiologia da doença. É caracterizada geralmente pela perda da capacidade de aprendizagem, de funções cognitivas e motoras,

memória, concentração, discernimento, agipatia amilóide, como consequência da degradação dos neurónios colinérgicos do sistema nervoso central <sup>17</sup>. Várias teorias têm sido propostas, chegando-se única e exclusivamente à conclusão de que a DA é consequência de muitos fatores bioquímicos, estudados ao pormenor por variados métodos de biologia molecular e biofísica molecular. São comuns às várias teorias os depósitos  $\beta$ -amilóide, a agregação proteica (emaranhados neurofibrilares insolúveis), baixos níveis da acetilcolina nas sinapses neuronais, o stresse oxidativo, etc. <sup>18</sup>

Sendo incurável, degenerativa e uma doença terminal, afecta aproximadamente 3% dos indivíduos com idades entre os 65-74 anos e 50% dos com mais de 85 anos. <sup>1, 19-21</sup>

É uma das doenças mais dispendiosas da era moderna, quer para o sistema social, quer para as famílias [22]. Estima-se que a doença de Alzheimer afetará 1 em cada 85 pessoas em 2050. <sup>23</sup>

### **1.5. Hipótese Colinérgica**

A natureza do sistema colinérgico faz com que este determina as manifestações clínicas da AD, bem como a resposta à terapêutica <sup>24</sup>. O sistema colinérgico é o mais afetado em casos de AD, dado ser nele onde se encontram os neurónios responsáveis pelas funções cognitivas, como por exemplo, a memória, a capacidade de raciocínio e aprendizagem, bem como a predisposição para a realização de tarefas do dia-a-dia <sup>25,26</sup>. Sendo constituído maioritariamente por neurónios de projeção e interneurónios, localizados no encéfalo e hipocampo respectivamente, este sistema está associado à diminuição da capacidade cognitiva e ao envelhecimento, como consequência da AD, deixando crer que existirá uma relação direta entre as funções cerebrais básicas e o decréscimo da concentração de acetilcolina nessas regiões do cérebro <sup>27,28</sup>. Em meados de 1970, muitos investigadores identificaram deficiências em marcadores pré-sinápticos colinérgicos, no córtex cerebral de doentes com AD <sup>29</sup>. Estes resultados foram também corroborados por Bartus *et al.*, quando verificaram a diminuição dos níveis e actividade do enzima responsável pela síntese da acetilcolina, o colina acetiltransferase, mas também de receptores muscarínicos e nicotínico, sugerindo, mais um vez, a existência de uma relação entre o sistema colinérgico e as funções cognitivas, levando finalmente, à formulação da hipótese colinérgica da doença de Alzheimer <sup>30</sup>. Dados posteriores revelaram também deficiências na captação e libertação da acetilcolina, em doentes com

AD<sup>31,32</sup>. Há também perda de neurónios piramidais e redução dos níveis de glutamato, aumentando a severidade da doença<sup>33</sup>. A disfunção relacionada com o sistema colinérgico é também acompanhada por dois acontecimentos muito importantes na etiologia da AD – a deposição do péptido  $\beta$ -amilóide e a formação de emaranhados neurofibrilares intracelulares insolúveis. Embora tenha havido nos últimos anos muitos progressos no sentido de se perceber o mecanismo bioquímico de formação de placas  $\beta$ -amilóide, a causa específica da degeneração dos neurónios colinérgicos ainda está por elucidar completamente<sup>34</sup>. Nas últimas décadas começou-se a traçar uma relação entre a transmissão colinérgica e o metabolismo da proteína precursora  $\beta$ -amilóide (APP).<sup>35</sup> Assim, e tendo em conta os acontecimentos bioquímicos que se dão no sistema colinérgico, este continua a ser um dos alvos principais no que toca à terapêutica e desenho de novos fármacos anti-AD.

### **1.6. Hipótese Amilóide e a proteína APP**

A teoria mais estudada e de certa forma aceite pela comunidade científica é a hipótese amilóide, sendo o foco principal na investigação etiológica da AD. Esta hipótese sugere que a deposição e acumulação em níveis elevados do péptido  $\beta$ -amilóide no sistema nervoso central é o principal factor que despoleta o aparecimento de manifestações clínicas associadas à doença de Alzheimer<sup>35</sup>. O péptido  $\beta$ -amilóide é produzido através da proteólise da proteína precursora amilóide (APP), reacção catalisada pelo  $\beta$ -secretase e  $\gamma$ -secretase. A APP é uma proteína transmembranar expressa em vários tecidos, principalmente nas sinapses dos neurónios. Embora a sua função ainda não esteja clarificada, acredita-se que possa estar envolvida na formação das sinapses do SNC, bem como na sinalização celular<sup>27,36</sup>. Possui cerca de 700 aminoácidos e sobre múltiplos processos de clivagem proteolítica por parte dos secretases. Pode ser processado por duas vias principais: a endossomal – lisossomal e a secretora. Os  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -secretases actuam em diferentes locais da sequência de aminoácidos da APP, com a formação de fragmentos de diferentes tamanhos e estruturas<sup>37</sup>. O  $\alpha$ -secretase cliva a APP entre os resíduos 16 e 17, formando-se um fragmento de 16 aminoácidos que não parece desempenhar um papel importante na amiloidogénese da AD<sup>38</sup>. A forma  $\beta$  é a mais agressiva, deriva da via endossomal – lisossomal, que envolve os  $\gamma$ -secretases. Formam-se péptidos de 40 e 42 aminoácidos, que pela sua conformação em folhas  $\beta$  apresenta maior propensão para se associar com outros monómeros e oligómeros, dando

origem a placas neurofibrilares <sup>1,39</sup>. Em doentes com AD estão maioritariamente as formas A $\beta$ <sub>1-40</sub> e A $\beta$ <sub>1-42</sub>, sendo considerados neurotóxicos e fibrinogénios <sup>40</sup>. Assim, a forma amiloidogénica do péptido  $\beta$ -amilóide é favorecida nos neurónios dada a elevada concentração de  $\gamma$ -secretases existente, enquanto a via não amiloidogénica prevalece noutros tecidos [41]. Sugeriu-se também que o A $\beta$  possa alterar a homeostase do cálcio e consequentemente alterações nas células da glia e nos neurónios. <sup>33,42,43</sup>

Esta teoria tenta explicar que, a deposição do péptido  $\beta$ -amilóide, originário da proteólise da APP, é responsável pela severidade da AD, embora, tal como as outras teorias sobre a etiologia da doença, ainda não seja completamente aceite, nem tão-pouco elucidada na sua totalidade <sup>8,44</sup>. Não havendo evidências concretas de que a demência observada nos doentes esteja relacionada com a deposição do péptido A $\beta$  (emaranhados neurofibrilares), a teoria amilóide continua até hoje sob constante escrutínio, embora as estratégias terapêuticas vigentes têm em conta a possível inibição da agregação do péptido e consequente melhoria cognitiva dos doentes.

#### **1.6.1. Hiperfosforilação da proteína tau ( $\tau$ )**

A proteína *tau* é uma proteína solúvel, presente em todas as células nucleadas, bem como nos neurónios, estando presentes 6 isoformas no sistema nervoso central, como resultado do *splicing* alternativo do seu gene <sup>45-47</sup>. A sua função é a formação e estabilização dos microtúbulos, através de domínios de ligação a microtúbulos. Em doentes com AD, esta proteína encontra-se hiperfosforilada, apresentando solubilidade alterada e uma estrutura propensa à agregação <sup>48-50,51</sup>. Esta fosforilação, catalisada por cinases e fosfatases, causa em último caso a desestabilização dos microtúbulos, que concomitantemente ao péptido  $\beta$ -amilóide acelera o processo de degradação dos neurónios colinérgicos. Os locais de fosforilação continuam também sob intensa investigação, de modo a se perceber melhor a via de sinalização e regulação da proteína, pelos cinases e fosfatases. O mecanismo bioquímico que relaciona a interação da proteína tau e o A $\beta$  continua por elucidar completamente, embora possa haver um efeito sinérgico que aumenta a neurodegeneração associada à AD. <sup>52</sup>

### 1.6.2. Stress oxidativo

Ainda dentro do complexo esquema etiológico da doença de Alzheimer, nos últimos anos, concluiu-se que o stresse oxidativo e os processos inflamatórios no SNC desempenham um papel preponderante no desenvolvimento e progressão da doença.<sup>53</sup> Dado o alto consumo de oxigénio no cérebro, a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (ex. anião superóxido, o radical hidroxilo, etc.), pode causar danos em quase todas as moléculas biológicas neuronais, como o ADN ou lípidos. Em doentes com predisposição para o desenvolvimento da AD, os ROS podem também desempenhar um papel importante na iniciação da agregação do A $\beta$  e no processo de fosforilação da proteína *tau*. Há evidências de que alterações na homeostase dos níveis de metais, seja também uns dos responsáveis pela geração e aumento dos ROS no cérebro e também ao aumento da agregação do péptido  $\beta$ -amilóide. Dada a complexidade, e tendo em conta o papel desempenhado pelos ROS na etiologia da doença de Alzheimer, começou-se já a utilizar estratégias terapêuticas que incluam antioxidantes, por forma a mitigar os efeitos drásticos daqueles no cérebro.<sup>5,6,70</sup>

## 1.7. Acetilcolinesterase (AChE) – estrutura e função

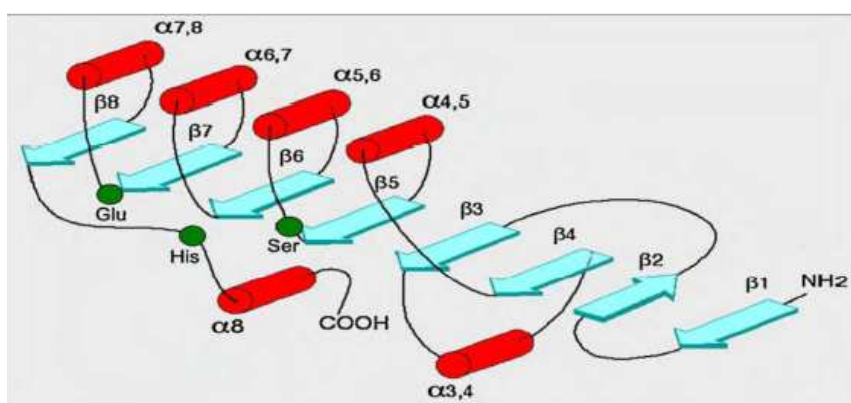
### 1.7.1. Generalidades sobre o AChE

O acetilcolinesterase (EC. 3.1.1.7) ou simplesmente AChE é um enzima pertencente à família dos hidrolases, actuando em ligações éster, mais especificamente sobre o éster carboxílico da acetilcolina<sup>15</sup>. Consiste na associação de diversas subunidades catalíticas de 70 – 80 kDa. Está presente maioritariamente nas junções neuromusculares e principalmente nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central, onde se faz a terminação sináptica<sup>1,15,54</sup>. Este enzima cataliza a hidrólise da acetilcolina a uma velocidade próxima do limite de difusão controlada, tornando-se assim, num dos enzimas mais eficientes e específicos até agora identificado<sup>55</sup>. Dada a função que desempenha nas sinapses, o AChE constitui um alvo principal para muitos agentes químicos, naturais ou sintéticos<sup>30</sup>. Outro enzima que faz parte da mesma família do AChE é o butirilcolinesterase (BuChE) que, à semelhança do AChE faz a hidrólise de ligações ésteres, neste caso da butirilcolina. Está presente nas sinapses do SNC e também no fígado, plasma, pâncreas, etc. A sua função ainda está por elucidar na sua totalidade, havendo autores que defendem a sua capacidade de regular o AChE, funcionando como mecanismo de compensação em relação àquele<sup>56</sup>.

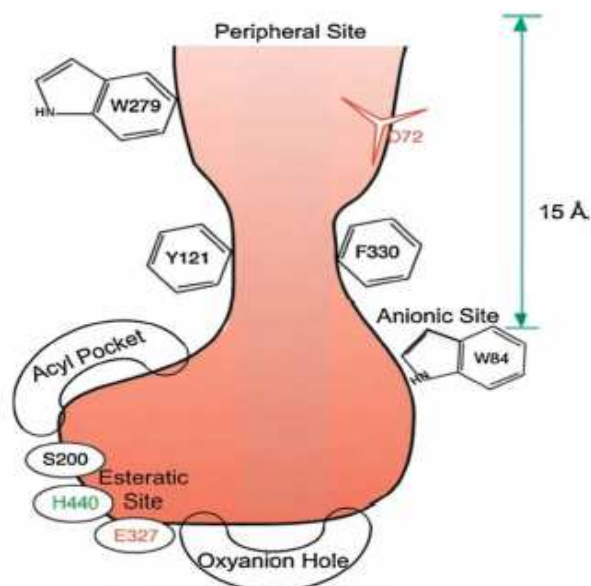
### 1.7.2. Estrutura do AChE de torpedo californica (TcAChE)

Existem várias formas oligoméricas de AChE identificadas e descritas na bibliografia. Estas aparecem geralmente complexadas com substratos ou inibidores. Estas formas são idênticas às encontradas nos vertebrados, mais especificamente nos músculos e nervos destes, embora a homologia na sequência de aminoácidos seja baixa Sussman *et al.* purificaram a primeira forma tetramérica de AChE em 1991 de *electrophorus electricus*, embora nenhuma informação estrutural tenha sido retirada dessa experiência.<sup>1,16,57</sup> Assim, a primeira estrutura em forma de cristal a ser caracterizada espectroscopicamente foi extraída de *torpedo californica*, TcAChE, complexado com inibidores, incluindo fármacos anti-Alzheimer. A análise estrutural do TcAChE permitiu o estudo da topografia do enzima e sobretudo do seu mecanismo de acção. O enzima é estruturalmente complexo, possuindo zonas de ligação ao substrato, para além do centro activo. A análise cristalográfica do TcAChE permitiu identificar diversos sítios que fazem parte da maquinaria catalítica do enzima. Observou-se a existência de uma tríade catalítica que é formada por 3 resíduos de aminoácido – Serina 200, Glutamato 327e a

Histidina 440, que se dispõem de forma planar na estrutura do enzima (Figura 2) <sup>16,58-60</sup>. O AChE possui também uma estreita e profunda cavidade de cerca de 20 Å de comprimento, atravessando quase metade da estrutura tridimensional do enzima, encontrando-se na base dessa garganta a tríade catalítica responsável pela hidrólise da ACh <sup>16</sup>. Estudos de cinética enzimática revelaram que o centro activo é constituído pelo centro aniónico catalítico (CAS) e pelo sítio aniónico periférico (PAS), correspondendo à maquinaria catalítica e à zona de ligação da acetilcolina, respectivamente <sup>26,28</sup>. O CAS consiste em dois resíduos, o triptofano 84 e a fenilalanina 330, enquanto o PAS é constituído pelos resíduos, tirosina 70 e triptofano 279, ver Figura 3 <sup>11,16,61</sup>. A acetilcolina é transportada por meio de 14 resíduos aromáticos alinhados ao longo da cavidade, antes de se ligar aos resíduos S200 da tríade catalítica, ver Figura 4. <sup>28</sup>



**Figura 2.** Representação esquemática da estrutura secundária do enzima, TcAChE. As hélices  $\alpha$  estão representadas pelos cilindros a vermelho, enquanto as folhas  $\beta$  pelas setas a azul. Os resíduos de aminoácidos que fazem parte do centro activo estão a verde <sup>16,60</sup>.



**Figura 3:** Representação esquemática da garganta catalítica do TcAChE, onde se evidenciam o CAS (Trp 84, Phe330) e o PAS (Trp 279, Tyr70), bem como a tríade catalítica na base (S200, H440, E327).<sup>28</sup>

Existindo grande variabilidade em termos de sequência de aminoácidos entre o acetilcolinesterase humano e o de *torpedo californica*, os resíduos que constituem o centro activo (CAS e PAS) encontram-se conservados em cerca de 50% nessas espécies, permitindo o uso do TcAChE como alvo nos estudos de *docking* e cinética enzimática.



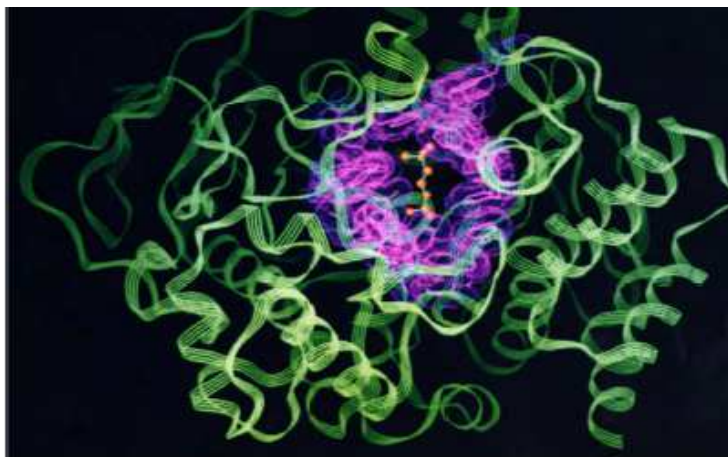
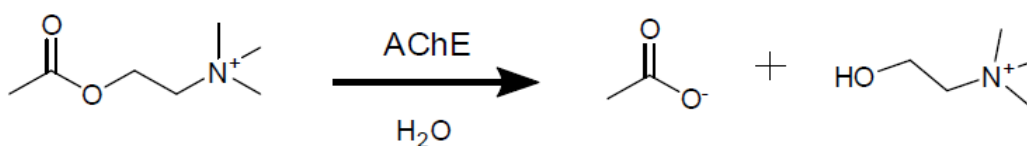


Figura 4: Estrutura tridimensional do acetilcolinesterase de *torpedo californica*, TcAChE. Os 14 resíduos aromáticos estão representados pela superfície rosa. A zona de ligação da acetilcolina encontra-se na base da garganta.<sup>62</sup>

### 1.7.3. Mecanismo catalítico do AChE

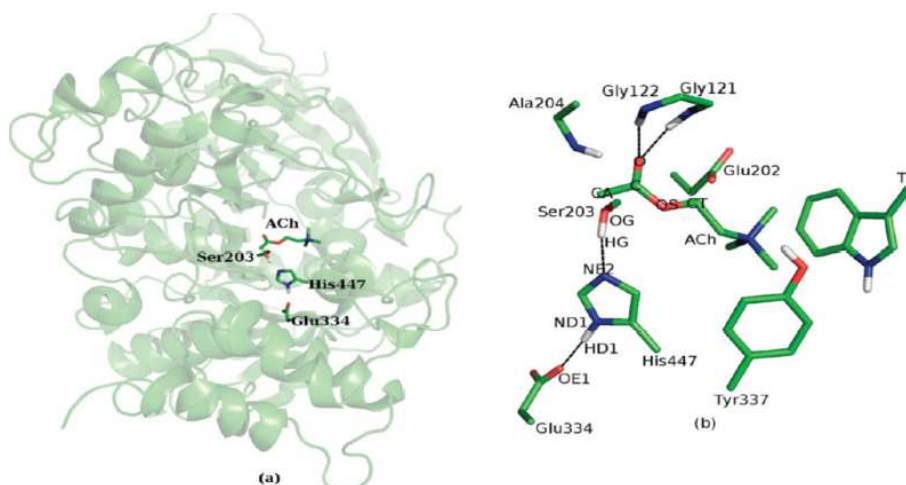
Como já foi referido a actividade principal da AChE é a hidrólise da acetilcolina, segundo o esquema 1, nas sinapses neuronais.



Esquema 1: Reacção de hidrólise da acetilcolina, catalisada pelo AChE

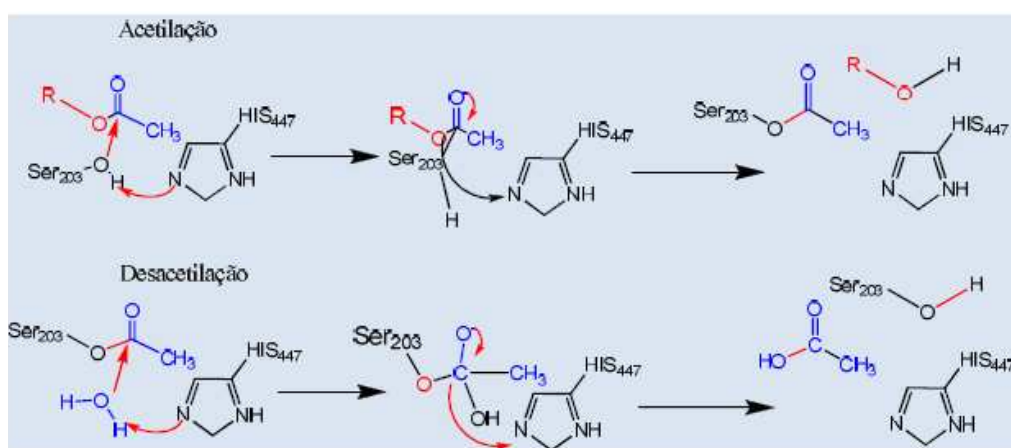
O mecanismo de hidrólise da ACh envolve os 3 resíduos da tríade catalítica, bem como a garganta catalítica (Figura 4)<sup>63</sup>. À semelhança de muitos hidrolases, o processo catalítico do AChE parece desenrolar-se em diferentes fases, como sendo a acetilação, seguida de desacetilação. Dada a sua grande eficiência (alto número de turnover), Yanzi *et al.*,<sup>66</sup> propuseram um mecanismo de reacção através de simulação da dinâmica molecular, dada a dificuldade em estudar experimentalmente os vários passos da catálise. Assim, após a ligação da acetilcolina ao trp 84, dá-se o transporte pela garganta catalítica, até à base do enzima. Isto acontece pelo facto do substrato apresentar uma carga positiva na colina e também pelas características electroestáticas do próprio enzima. O primeiro passo envolve o ataque nucleofílico da serina 203 ao carbonilo da ligação éster e a transferência de um protão da ser 203 para a histidina 447, com a

formação de um intermediário tetraédrico. A ligação éster é quebrada, com a formação do complexo acilo – enzima e saída da colina (Figura 5).<sup>68</sup>



**Figura 5:** Ilustração do complexo formado entre o centro activo do enzima e a acetilcolina (a) – representação da estrutura do centro activo; (b) – resíduos envolvidos na catálise enzimática.<sup>64</sup>

A desacetilação ou regeneração do enzima dá-se de forma idêntica ao processo de hidrólise da ACh, ver Figura 6,<sup>65</sup>. Há evidências de que o resíduo de Glu 202 (Figura 5) possa sofrer uma protonação no processo. A protonação desse resíduo faz com que a energia livre de activação seja ainda mais baixo, quando comparado com o estado desprotonado.<sup>64</sup>



**Figura 6:** Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pelo AChE e respectiva regeneração do enzima.<sup>64</sup>

Na desacetilação, uma molécula de água faz um ataque nucleofílico ao carbonilo da acetilserina. Esta reacção é facilitada pela transferência de um protão da histidina 447. Seguidamente, dá-se a quebra da ligação, com o regeneração do enzima *wild-type* e o anião acetado.<sup>64,66</sup>

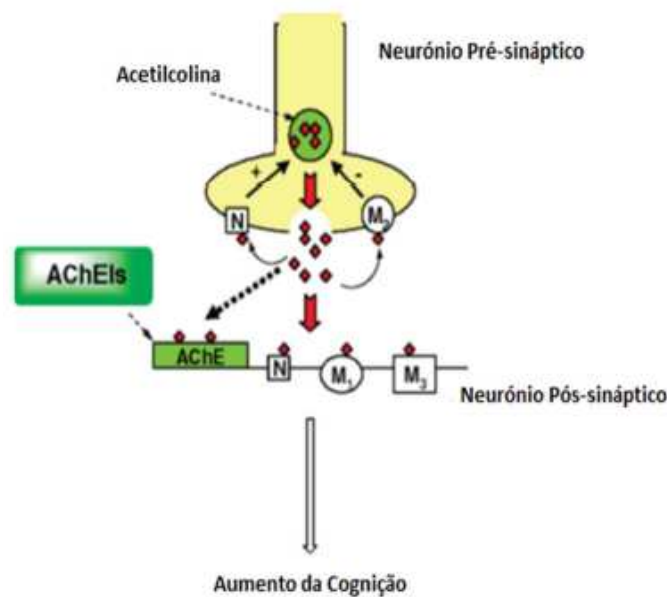
### **1.8. Tratamento da Doença de Alzheimer**

Dada a severidade da AD e sendo incurável, os fármacos existentes no mercado só mitigam os efeitos da doença, ou seja têm como objectivo a melhoria da qualidade de vida da doente, através do tratamento dos sintomas. Dada a inexistência de uma explicação concisa, completa e esquematizada da etiologia da doença, torna também difícil a descoberta de um fármaco que consiga actuar e parar a progressão da AD. Assim, e tendo em conta o carácter multifacetado da AD, muitos têm sido os esforços no sentido de desenhar e sintetizar um fármaco que possa atacar vários alvos, tendo como ponto de partida as várias teorias existentes sobre a etiologia da AD. Embora a procura, de há décadas para cá, tenha sido muito intensa e envolvendo elevados recursos financeiros, a mesma não tem sido fácil. Até hoje os fármacos disponíveis no mercado só melhoram a cognição, atenção, pensamento, destreza motora dos doentes, não atacando propriamente dito o cerne da doença. Estes compostos são os inibidores do AChE que têm como objectivo o aumento da concentração da acetilcolina nas sinapses, fazendo com que haja melhorias nos sintomas apresentados pelos doentes. Actualmente, e com os avanços nas áreas da neurofisiologia, já se começaram a direccionar a investigação para a hipótese péptido  $\beta$ -amilóide e tentar, através de fármacos multifuncionais, inibir a agregação daquele péptido, mas também a via proteolítica da APP e formação das placas amilóides. Com esta nova estratégia, ao contrário do uso dos inibidores do AChE, pretende-se não só melhorar os sintomas apresentados pelo doente, mas também retardar de forma significativa a progressão da demência característica da doença.

#### **1.8.1. Inibidores do acetilcolinesterase**

A hipótese colinérgica da AD, levou a que se desenvolvessem diferentes tipos de fármacos que pudessem actuar no sistema colinérgico, mais precisamente nas sinapses. Dessa forma, ao inibir o AChE, estariam criadas as condições para que houvesse um aumento dos níveis de acetilcolina, melhorando assim as funções cognitivas. Antes porém, houve a tentativa, infrutífera de repor os níveis de acetilcolina através dos seus

precursores, a lecitina e a colina <sup>67</sup>. Seguiu-se então a primeira geração de fármacos anti-AChE, que embora sejam muitos, o seu mecanismo de acção pouco difere um do outro (Figura 7) <sup>54</sup>. O primeiro composto a ser desenvolvido foi a tacrina em meados dos anos 80. Foi aprovado para o tratamento da AD em alguns países, mas foi retirado posteriormente por causa dos efeitos adversos drásticos na função hepática e sistema cardiovascular <sup>68,69</sup>. Optou-se por desenvolver novos compostos, que pudessem apresentar menos efeitos colaterais e que fossem também mais específicos. Assim surgiu a segunda geração de inibidores dos colinesterases, que compreende o donepezil, a galantamina, o metrifonato, a rivastigmina, entre outros (ver Figura 8).<sup>54,70</sup>

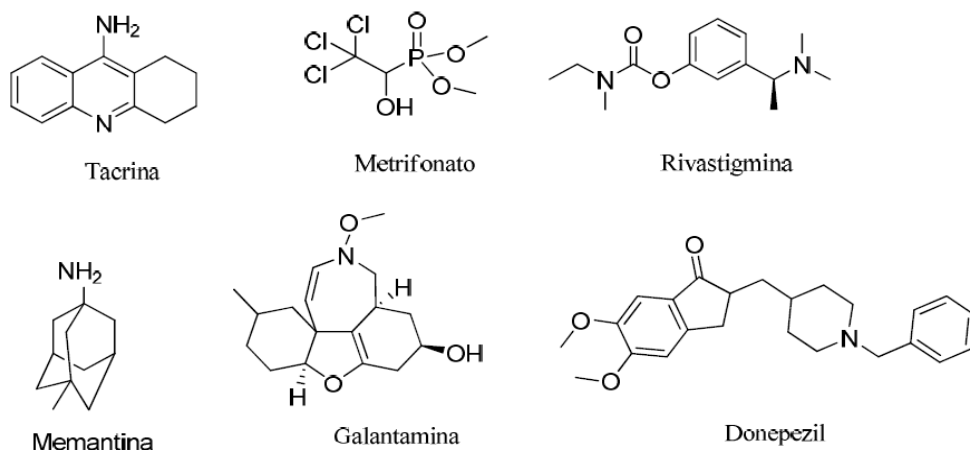


**Figura 7:** Mecanismo de actuação dos inibidores dos colinesterases no sistema colinérgico. O ACh é libertado na fenda sináptica onde activa os receptores pós-sinápticos e pré-sinápticos (nicotínicos e muscarínicos) levando ao aumento da transmissão colinérgica, sendo depois hidrolisado pelo AChE, que é o alvo dos inibidores no tratamento paliativo da AD. <sup>38</sup>

Tabela 1: Medicamentos aprovados na Europa e nos EUA para o tratamento paliativo da Doença de Alzheimer (AD)

Fármaco	Tacrina	Donepezil	Rivastigmina	Galantamina	Memantina
Mecanismo	AChEI, BuChEI	AChEI	AChEI, BuChEI	AChEI	Antagonista dos receptores NMDA
Dose/Frequência (mg/d)	40 – 160 (4x)	5 – 10 (1x)	3 – 12 (2x)	8 – 24 (2x)	5 – 20 (2x)
t <sub>1/2</sub> (horas)	1.3 – 2	70	2 – 8	6 – 8	60 – 80
Metabolismo <sup>a</sup>	CYP1A2	CYP2D6	Não hepático	CYP2D6	Não hepático
Ligação a proteínas	75%	96%	40%	18 - 19 %	45%
Toxicidade Hepática	Sim <sup>b</sup>	Não	Não	Não	Não

AChE – Acetilcolinesterase; BuChE – Butirilcolinesterase; NMDA – N-metil D-Aspartato; <sup>a</sup>Metabolismo hepático pelo sistema citocromo P450; <sup>b</sup>Requer análises periódicas aos níveis dos transaminases (AST e ALT) do fígado<sup>71</sup>



**Figura 8:** Estruturas químicas dos inibidores dos colinesterases de primeira e segunda geração

Os inibidores de segunda geração apresentam actividades inibitórias próximas da da tacrina, mas são clinicamente mais favoráveis no que toca aos efeitos colaterais.<sup>72-74</sup>

No caso do donepezil, uma toma diária é suficiente para o aumento da capacidade cognitiva do doente. A maior parte dos inibidores não são tóxicos hepaticamente.<sup>75</sup> Outras formas de tratamento da AD têm como alvo o processamento da APP e também agregação do péptido  $\beta$ -amilóide. No caso da APP, a estratégia passaria pelo estímulo do  $\alpha$ -secretase, favorecendo assim a via proteolítica não-amiloidótica. O etazolato é um activador dos  $\alpha$ -secretases e já está em fase de ensaios clínicos. Outra estratégia passa por inibir o processo de agregação do péptido A $\beta$ . Um dos métodos já desenvolvidos passa pela inserção de pequenos péptidos sintéticos que fazem a desestabilização da conformação  $\beta$ , evitando a oligomerização<sup>76</sup>. O tramisprosato é um dos inibidores da oligomerização já desenvolvidos e encontra-se já na segunda fase de ensaios clínicos e há evidências da diminuição de placas  $\beta$ -amilóide no SNC, em doentes tratados com este fármaco<sup>77</sup>.

## 2. Resultados e discussão

### 2.1. *Design* dos inibidores

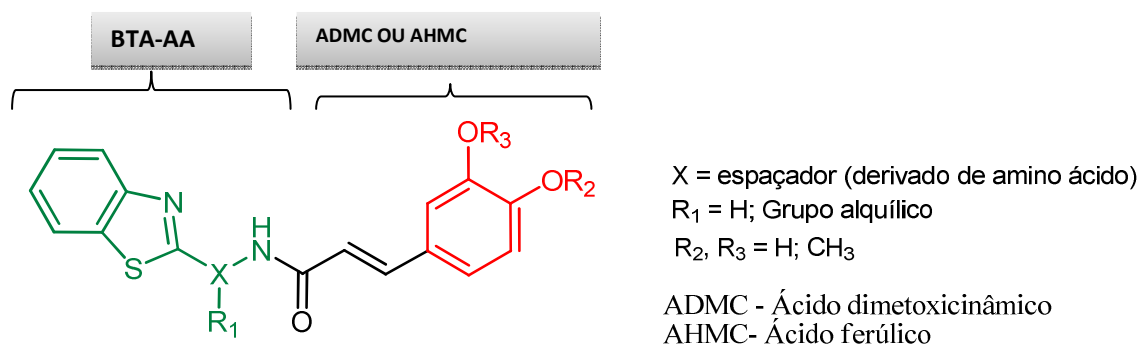
O objectivo deste projecto foi o desenvolvimento de novos inibidores do enzima acetilcolinesterase (AChE), com potencial aplicação no tratamento paliativo das diversas formas da doença de Alzheimer (DA). Tais inibidores serão bi-funcionais, na medida em que para além de apresentarem capacidade inibitória em relação ao AChE, terão alguma capacidade antioxidante “*in vitro*”. A estratégia adoptada foi a do desenvolvimento de inibidores com alguma analogia com os já disponíveis no mercado. Estes inibidores foram desenhados com o objectivo de actuarem de acordo com o seguinte mecanismo:

1º - Estabelecerem interações com o centro activo do enzima (CAS) e em alguns casos com o sítio aniónico periférico (PAS) do enzima.

2º - Inibir o mecanismo de formação das placas  $\beta$ -amilóide, mediado pelo PAS do enzima. Esta acção do inibidor poderá ser conseguida através do benzotiazole, que terá alguma capacidade de reconhecimento do péptido  $\beta$ -amilóide.

O trabalho desenvolvido está inserido num projecto mais amplo a decorrer no laboratório, intitulado “*Novos Tipos de Compostos Orientados para Receptores Biológicos com Potenciais Aplicações Farmacológicas*”.

Assim, a estrutura geral dos inibidores desenvolvidos será do tipo:

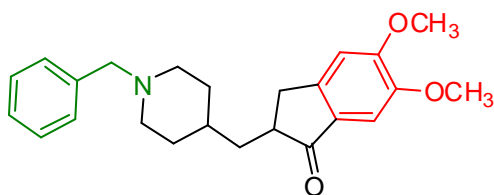


Esquema 2: Estrutura geral dos inibidores do AChE desenvolvidos. BTA-AA - Derivado benzotiazole do 2-aminotiofenol ligado a um resíduo de aminoácido (espaçador), com hipotética afinidade para o PAS do enzima e para o péptido  $\beta$ -amilóide. DMCA - ácido dimetoxicinâmico, análogo estrutural do donepezil, com afinidade para o centro activo do enzima

No presente trabalho seguiu-se uma abordagem mais orientada para o desenvolvimento de compostos *multi-target*, recorrendo dessa forma a ferramentas computacionais para o *design* dos mesmos.

Como já foi descrito anteriormente, a estrutura geral dos inibidores consistiu no acoplamento de duas entidades químicas diferentes entre si, que possam conferir características multifuncionais à molécula alvo. Assim, tendo em conta a estrutura do donepezil (esquema 3), tentou-se acoplar um dos derivados do ácido cafeico (ácido dimetoxicinâmico, ou ácido ferúlico), que é, em parte, responsável pela elevada actividade inibitória no donepezil (a vermelho, nos esquemas 2 e 3), com o derivado benzotiazole (a verde) de forma a poder reconhecer o péptido  $\beta$ -amilóide. Optou-se pelo benzotiazole (BTA) porque há indícios de que há uma contribuição importante do enzima na formação de placas  $\beta$ -amilóide, através do sítio periférico, e também que esta parte da molécula poderá reconhecer e descontinuar o processo de formação de placas e emaranhados no sistema colinérgico <sup>1,3,4</sup>. Para além disso, de acordo com estudos preliminares de *docking*, este grupo poderá ocupar a posição do grupo benzilo do donepezil (a verde no esquema 2), quando ligado ao centro activo do AChE, sendo as interações estabelecidas aparentemente semelhantes.





Esquema 3: Estrutura química do fármaco donepezil para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer. À vermelho destaca-se a parte da molécula que serviu de modelo aos novos inibidores desenvolvidos neste trabalho

Assim, tendo em conta a estrutura geral dos inibidores (ver esquema 2), construiu-se uma biblioteca de compostos utilizando diferentes espaçadores, na maior parte das vezes aminoácidos. Esta biblioteca foi submetida a estudos de modelação molecular recorrendo ao programa GOLD , versão 4.0.<sup>82</sup> Posteriormente, pela análise qualitativa dos resultados de modelação, sintetizaram-se os compostos que apresentavam melhores perfis inibitórios, “*in silico*”. De salientar que, concomitantemente à capacidade inibitória, o derivado do ácido cafeico ou análogo do donepezil deverá conferir características de antioxidante aos compostos alvo.

Na desenvolvimento dos compostos, seguiu-se uma abordagem crítica e direccionada, características inerentes aos próprios princípios da Química Medicinal.

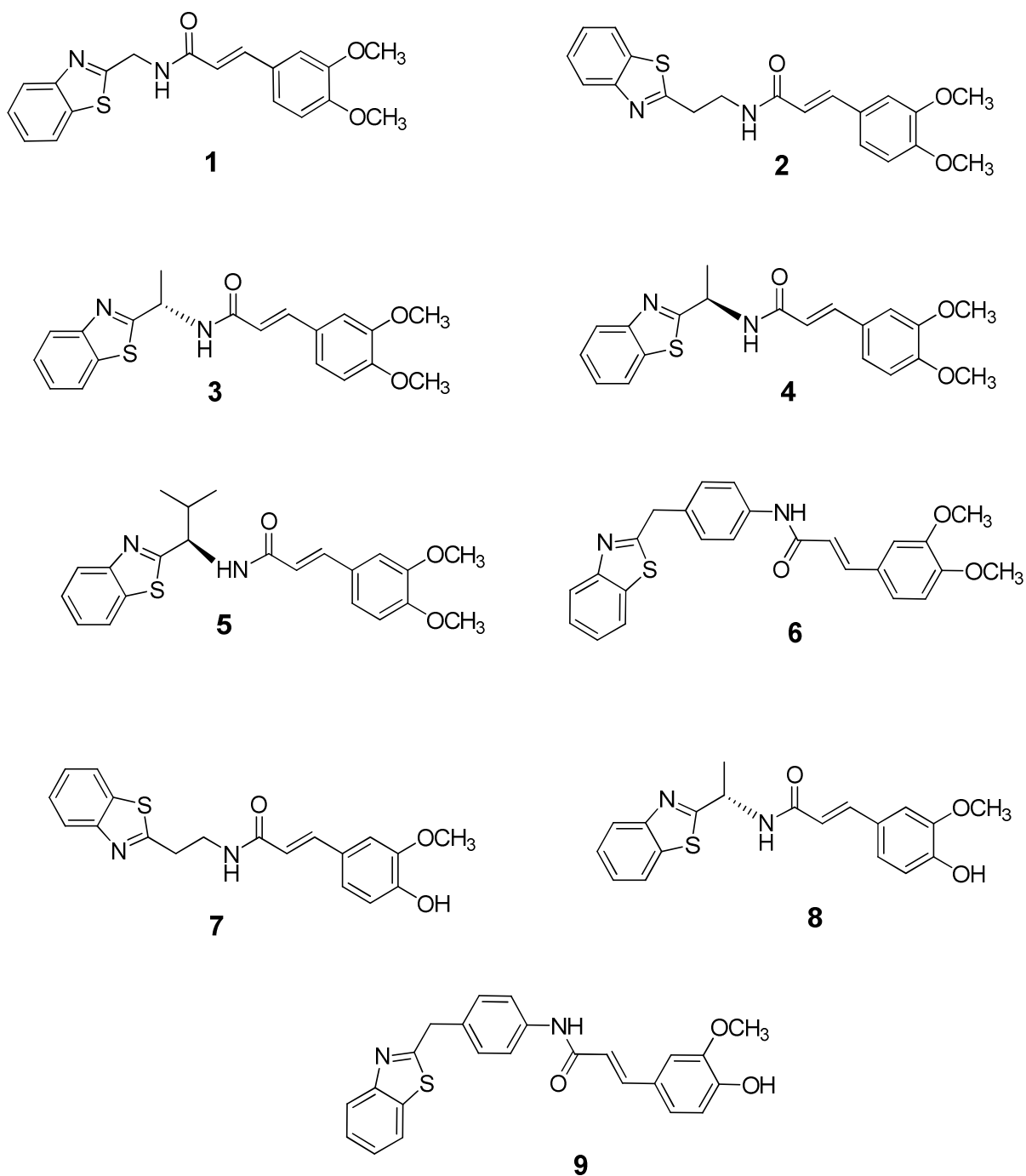
Os compostos foram preparados como descritos atrás e sintetizados através de métodos padrão de química de síntese presentes no laboratório e discriminados mais a frente neste capítulo. Ainda como características incorporados nos compostos, estes terão alguma lipofilicidade, para além da inibição e capacidade antioxidante. Espera-se também estudar, numa fase posterior do projecto, os efeitos destes novos compostos em linhas celulares neuronais de modo a inferir sobre a sua capacidade neuroprotectora do ponto de vista bioquímico.

Relativamente aos espaçadores utilizados, teve-se em consideração o tamanho da global molécula e consequente massa molecular, no sentido de facilitar a sua passagem pela barreira hemato-encefálica, a lipofilicidade, e também a capacidade do inibidor em encaixar-se no centro activo do enzima.

## **2.2. Conjunto de inibidores preparados e intermediários**

O conjunto dos inibidores preparados foi, no geral, produto do acoplamento das duas entidades químicas atrás descritas, variando o elemento espaçador (grupo X-R<sub>1</sub> do esquema 2). Tendo em conta os resultados do *docking*, escolheu-se os compostos que apresentavam melhores interações com o centro activo do enzima (CAS) e com o sítio aniónico periférico (PAS) <sup>1</sup>. As variações testadas computacionalmente dependeram de vários factores. Inicialmente testou-se os aminoácidos naturais e não naturais disponíveis em laboratório, e posteriormente outros aminoácidos que se afiguraram promissores, mediante o conhecimento estrutural do enzima e em correlação com os primeiros resultados de *docking* obtidos, para além das outras propriedades químicas mencionadas acima (peso molecular, lipofilicidade, etc.).

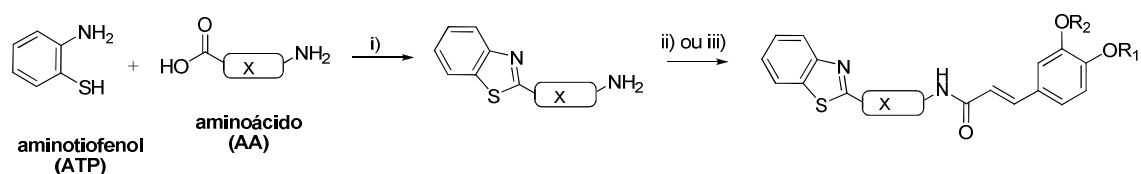
Desta primeira etapa de *design* molecular, resultaram vários compostos, dos quais foram sintetizados nove. Estes são apresentados seguidamente, no esquema 4.



Esquema 4: Estruturas dos compostos desenhados e sintetizados (**1** – **9**), seguindo a estrutura geral descrita anteriormente (ver esquema 2)

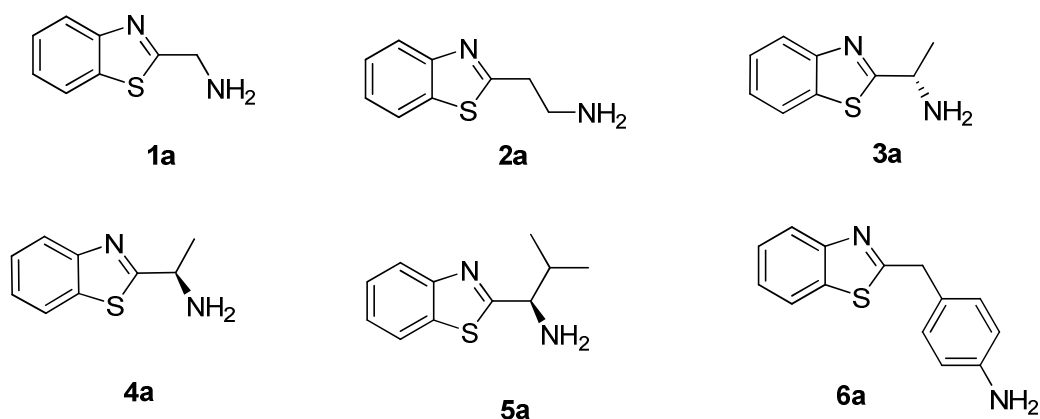
### 2.3. Estratégias de síntese

Para a síntese dos compostos (**1** a **9**), apresentados no esquema 4, recorreu-se, como já referido, aos derivados benzotiazólicos dos aminoácidos, seguindo um esquema sintético total, como descrito no esquema 5.



Esquema 5: Esquema geral para a síntese dos compostos alvos. Reagentes e condições: i) ácido polifosfórico (PPA), 220 °C; ii) ácido dimetoxicinâmico ( $R_1=R_2=CH_3$ ) ou ácido ferúlico ( $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ), EDCI/DMAP cat., T.amb; iii) ácido dimetoxicinâmico ( $R_1=R_2=CH_3$ ) ou ácido ferúlico ( $R_1=H$ ,  $R_2=CH_3$ ), TBTU/NMM, 0 °C

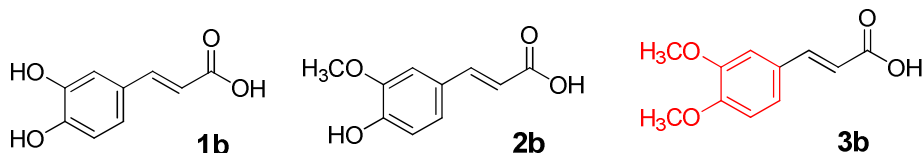
Apresentam-se, de seguida, os compostos intermediários (esquema 6), derivados do aminotiofenol (ATP) com os respectivos aminoácidos (AA).



Esquema 6: Estrutura dos derivados de benzotiazole preparados (**1a-6a**), como intermediários dos compostos finais

As diferenças entre os inibidores preparados prendem-se com o tipo de espaçador utilizado (grupo X, no esquema 5), referente ao aminoácido de partida.

Quanto ao grupo a acoplar aos derivados benzotiazólicos dos aminoácidos (compostos **1**–**6**), consistiu num derivado do ácido cafeico, metilado nos dois grupos OH, nas posições *meta* e *para*, o 3,4 - ácido dimetoxicinâmico (composto **3b** do esquema 7). Usou-se ainda o 3-metoxi-4-hidroxi-cinâmico (composto **2b** do esquema 7) para a síntese dos compostos (**7-9**).



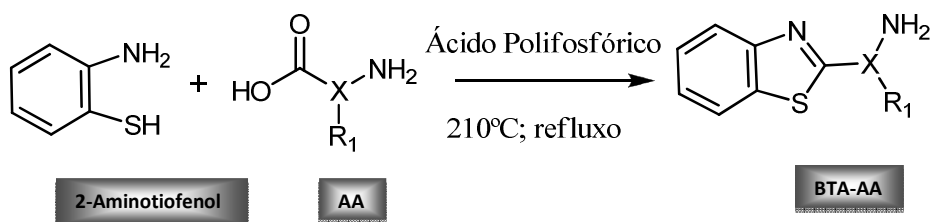
Esquema 7: Estrutura química dos derivados do ácido cafeico (**2b**, **3b**) e ácido cafeico (**3b**)

Pode observar-se a analogia estrutural entre o grupo dimetoxibenzeno (a vermelho) dos derivados do ácido cafeico (esquema 7) e o mesmo grupo donepezil (esquema 3).

Os compostos acima apresentados (**1-9**, do esquema 4), apesar de apresentarem o mesmo esqueleto básico, contém grupos funcionais diferentes que, deverá consequentemente resultar numa diferenciação de propriedades assim como os na estratégia ddas respectivas sínteses. Optou-se por desenvolver estratégias de síntese que melhor se adequavam ao tipo de substituintes presentes na molécula e à natureza do espaçador utilizado na síntese do respectivo derivado benzotiazole (compostos **1a-6a** do esquema 6). As diferenças refletem-se não só no tipo de material de partida mas também no agente de acoplamento - tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurónio (TBTU) ou 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil-carbodiimida (EDCI) ou com as condições experimentais de síntese (temperatura, pH, tipo de solvente usado, etc.). A seguir seguem-se as estratégias seguidas, de acordo com as semelhanças entre os processos sintéticos e com o tipo de agente de acoplamento usado.

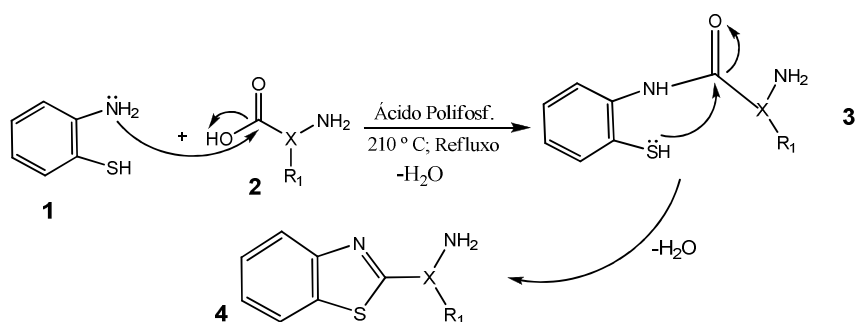
## 2.4. Mecanismo de síntese dos derivados benzotiazole

Neste subcapítulo, descreve-se o mecanismo e estratégia de síntese seguida no que concerne à síntese dos derivados benzotiazólicos dos aminoácidos. Assim, o mecanismo de reacção é o seguinte:



Esquema 8: Reacção geral de síntese do derivado benzotiazole do aminoácido ou espaçador

O processo de síntese do BTA consistiu basicamente em fazer reagir o 2-aminotiofenol com o aminoácido (espaçador) a  $210^\circ\text{C}$ , sob refluxo, obtendo-se o derivado benzotiazole do aminoácido. O mecanismo químico inerente à reacção encontra-se descrito no esquema 9.

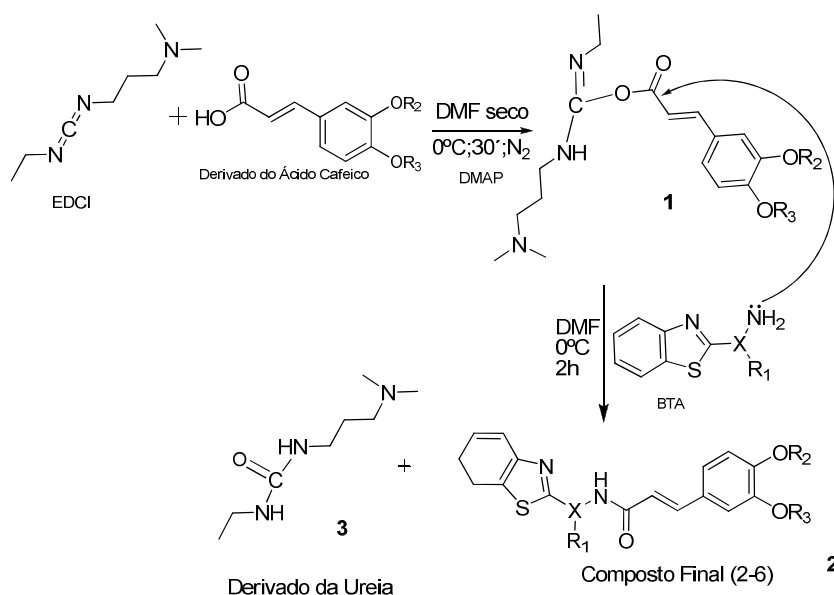


Esquema 9: Mecanismo de reacção geral da síntese do derivado benzotiazole (BTA). O grupo  $\text{R}_1$  representa possíveis grupos laterais dos aminoácidos

O mecanismo de reacção engloba inicialmente um ataque nucleofílico do grupo amina do 2-aminotiofenol (1) ao carbonilo do grupo carboxílico do aminoácido (2), com a formação de um composto de transição (3) altamente reactivo. Este, por sua vez, sofre um novo ataque nucleofílico, intramolecular, ao carbonilo pelo grupo tiol de 3, seguido de des-hidratação e formação do composto final (4). Esta estratégia permitiu a síntese dos derivados benzotiazole com altos rendimentos.<sup>2,3</sup>

## 2.5. Síntese dos compostos finais (2-6) utilizando EDCI como agente de acoplamento

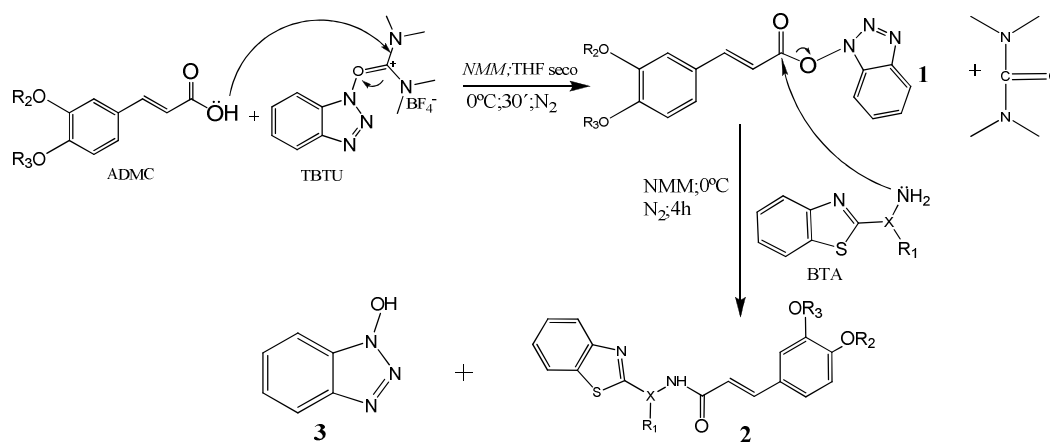
Este processo consistiu no acoplamento de uma amina ( $\text{NH}_2\text{R}'$ ) do BTA a um ácido carboxílico previamente activado com EDCI. A activação daquele baseia-se no uso de quantidades estequiométricas do ácido em questão e do agente de acoplamento, EDCI, num solvente aprótico seco, no caso a dimetilformamida (DMF). Dada a presença do EDCI e da base orgânica, di-aminopiridina (DMAP), forma-se um éster reactivo (**1**) (ver mecanismo no esquema 10). O composto final (**2**) é obtido após o ataque nucleofílico da amina do BTA ao grupo carbonilo do éster reactivo. Em alguns casos teve-se que aumentar a estequiometria em relação à base orgânica para que houvesse o ataque nucleofílico da amina ao éster reactivo. Dessa forma, evita-se que alguma protonação ao grupo amina subsista e possa impedir o ataque nucleofílico. Como produto secundário da reacção de acoplamento forma-se um derivado da ureia (**3**). Esta estratégia de síntese permitiu obter o composto final desejado, com rendimentos entre os 60-80%. Pelas técnicas de análise estrutural confirmou-se que de facto se havia formado o inibidor em questão.



Esquema 10: Mecanismo da reacção geral de acoplamento de uma amina  $\text{NH}_2\text{R}'$  a um ácido carboxílico usando EDCI como agente de acoplamento. Os substituintes  $\text{R}_2$  e  $\text{R}_3$  podem ser H e/ou  $\text{CH}_3$  respectivamente. O grupo X é o espaçador e o  $\text{R}_1$  grupo lateral do AA

## 2.6. Síntese dos compostos (1, 7-9) utilizando TBTU como agente de acoplamento

Nesta secção descreve-se a estratégia seguida para a síntese dos compostos **1**, **7-9** utilizando TBTU como agente de acoplamento (ver esquema 11). Optou-se pelo TBTU nestes compostos como alternativa ao método anteriormente descrito (com EDCI). Com o EDCI estas reacções não ocorriam ou então formavam-se produtos secundários, (nalguns casos ésteres estáveis resultantes da reacção do ácido com o EDCI). Este processo baseou-se também na activação do ácido com o agente de acoplamento em THF seco, e subsequente ataque nucleofílico por parte da amina do BTA. Neste caso, usou-se como base orgânica a *N*-metilmorfolina que, além de catalizar a reacção também tem como função a desprotonação da amina (forma hidrocloreada). Inicialmente forma-se o éster do ácido (**1**) que, dada as suas características altamente reactivas, reage com o BTA desprotonado, formando-se o composto final desejado e o 1-hidroxibenzotriazol (**3**) como produto secundário da reacção principal (composto solúvel em água, facilitando assim a purificação do produto desejado).



Esquema 11: Mecanismo da reacção geral de acoplamento de uma amina  $\text{NH}_2\text{R}'$  a um ácido carboxílico usando TBTU como agente de acoplamento. De realçar que, para os compostos 7-9 o substituinte  $\text{R}_3$  é um átomo de hidrogénio

Este tipo de acoplamento permitiu obter o composto final como produto maioritário da reacção, embora com rendimentos inferiores ao método com EDCI. A síntese dos



compostos **1**, **7**, **8** e **9** só foi possível usando este método. No caso dos compostos **7**, **8** e **9** usou-se o ácido ferúlico para acoplar ao BTA, aumentando assim a sua capacidade antioxidante, bem como a probabilidade de se estabelecerem possíveis ligações por pontes de hidrogénio com resíduos do centro activo do enzima.

## **2.7. Estudos de inibição enzimática e da capacidade antioxidante**

Os compostos desenvolvidos foram estudados no que diz respeito à sua capacidade inibitória do enzima acetilcolinesterase, bem como à sua capacidade antioxidante. Neste capítulo estão focados os principais objectivos deste trabalho de investigação, sendo então expostos os resultados obtidos e respectiva discussão. Como ferramenta adicional de análise dos resultados de inibição, realizaram-se estudos de simulação computacional através do *docking* enzima-inibidor. Dessa forma, poder-se-á inferir sobre as interações enzima-ligando e consequentemente fazer correlações entre os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos “*in vitro*” e a previsão feita “*in silico*”.

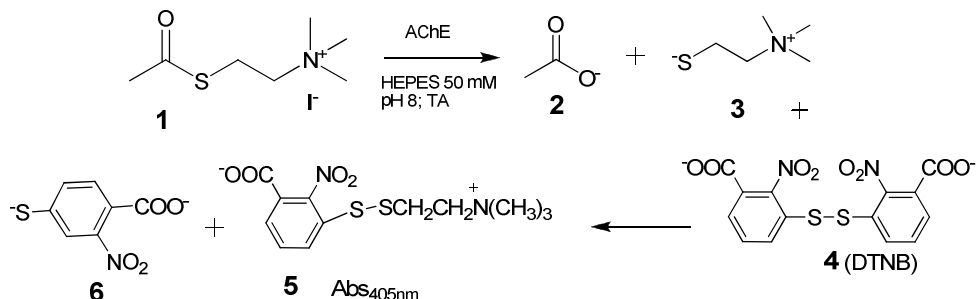
### **2.7.1. Inibição do acetilcolinesterase (AChE)**

A estratégia seguida para a avaliação da capacidade inibitória dos compostos foi, num primeiro passo, determinar a ordem de grandeza de inibição, através da realização de um *screening* a uma gama de concentrações larga, como por exemplo entre as centenas de nanomolar e as centenas de micromolar. Dessa forma, foi possível inferir uma primeira aproximação sobre a capacidade de inibição dos compostos desenvolvidos. Tendo em conta os resultados desse primeiro varrimento, realizaram-se ensaios numa gama de concentrações mais restrita, com o objectivo de determinar o respectivo valor de IC<sub>50</sub>.

### **2.7.2. Considerações sobre o método e substratos usados**

Na realização dos testes de inibição do acetilcolinesterase (AChE) por parte dos compostos desenvolvidos, foi seguida o método indirecto abaixo apresentado no esquema 12, desenvolvido em 1959 por *Ellman et. al.*,<sup>86</sup>. Este consiste, numa primeira fase, na hidrólise do substrato do AChE, o iodeto de acetiltiocolina (**1**), com a formação de ácido acético (**2**) e tiocolina (**3**). Subsequentemente o reagente de Ellman (**4**), o ácido 5,5'- ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) reage com o grupo SH da tiocolina formando-se o composto **5** (amarelo), que possui um pico de absorção máxima a 405

nm <sup>[8]</sup>. Uma vantagem deste método em relação a outros é a sua simplicidade, rapidez e sensibilidade na determinação das actividades dos colinesterases (AChE e BuChE).



Esquema 12: Descrição geral do método de Ellman para a determinação da actividade dos colinesterases (neste caso AChE).

Este método permite desde logo determinar a velocidade enzimática, já que esta é proporcional ao declive da curva de absorvência em função do tempo, a 405 nm <sup>86</sup>. De referir que este método é válido para tempos de ensaio entre os 4 e os 5 min, ou seja numa zona onde ainda se verifica a linearidade da curva de absorvência.

Tendo em conta que o objectivo é a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> dos compostos desenvolvidos, seguiu-se a seguinte estratégia com vista ao tratamento dos dados obtidos.

Assim, na presença de um composto que possa competir com o substrato do enzima, no caso, o iodeto de acetiltiocolina, designar-se-á por IC<sub>50</sub> como sendo a concentração necessária para a qual a velocidade da reacção de hidrólise, levada a cabo pelo enzima, é reduzida em 50%. Podemos determinar este parâmetro através da relação das actividades iniciais da reacção na presença (v<sub>1</sub>) e ausência (v<sub>0</sub>) de inibidor a uma dada concentração de inibidor, [I]. Assim, matematicamente tem-se:

$$\frac{v_1}{v_0} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad \text{Equação 1}$$

Os resultados obtidos são exemplificados com as curvas de absorvência em função do tempo na presença e ausência do composto **3** (Figura 9)

Através da relação  $v_1/v_0$  obtém-se a actividade enzimática na presença do inibidor, que é expressa normalmente em percentagem de inibição (ver tabela 2). Para a determinação dos valores de  $IC_{50}$  fez-se o ajuste da equação 1 ao total dos resultados de inibição obtidos para cada ensaio.

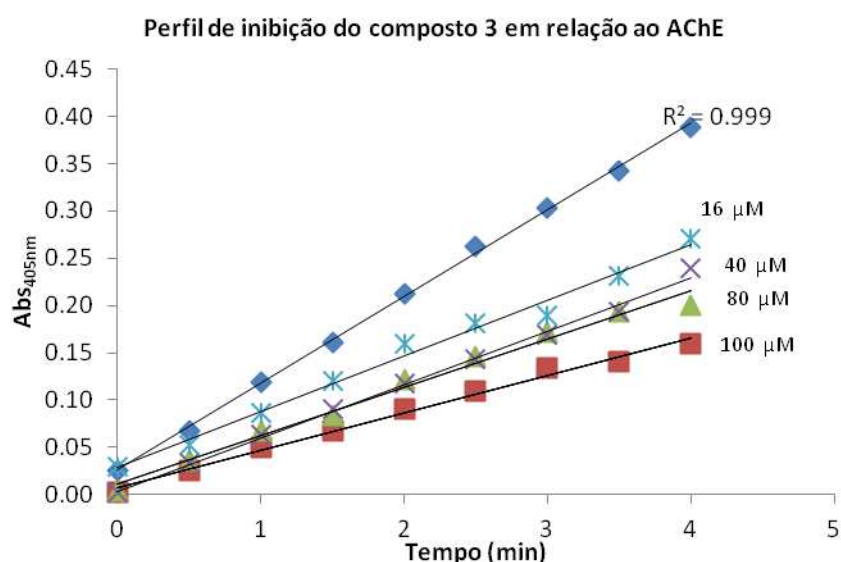


Figura 9: Gráficos de absorvência a 405 nm ( $Abs_{405nm}$ ) em função do tempo (min), em experiências de hidrólise do substrato, iodeto de acetiltiocolina, catalisada pelo acetilcolinesterase (AChE), na ausência (0  $\mu M$ ) e na presença do composto 3 como inibidor (16 – 100  $\mu M$ )

Tabela 2: Perfil de inibição em relação ao acetilcolinesteras do composto 3 baseado na experiência anteriormente descrita

AChE	Concentração de inibidor ( $\mu M$ )			
	16	40	80	100
% Actividade enzimática	75	70	61	48
% Inibição	25	30	39	52

Na **figura 9** e na **tabela 2** estão compilados os resultados de inibição do composto **3** em relação ao acetilcolinesterase. Fez-se os ensaios a quatro concentrações diferentes (16, 40, 80 e 100  $\mu\text{M}$ ), bem como do respectivo branco. Observa-se uma certa inibição do enzima na presença do inibidor, através do decréscimo do declive da reta na ausência de inibidor e na presença daquela a uma concentração de 16  $\mu\text{M}$ . Conclui-se também que não existe uma relação de proporcionalidade entre a concentração de inibidor e o grau de inibição do enzima. Este facto poderia ser confirmado e mais profundamente explorado através de outros estudos de cinética enzimática, com vista à determinação do tipo de inibição e respectivas constantes cinéticas.

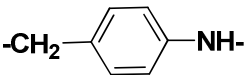
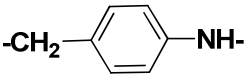
### 2.7.3. Resultados de inibição enzimática

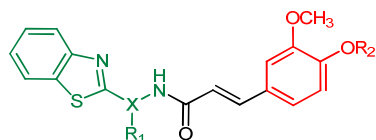
Dentro do propósito do projecto, o conjunto de inibidores desenvolvidos foi testado perante o acetilcolinesterase de *electrophorus electricus*. Na **tabela 3** estão os resultados obtidos, bem como do composto referência, donepezil, para fins comparativos.

A terminologia usada, para uma melhor compreensão dos resultados é a seguinte:

O grupo X refere-se ao espaçador usado na síntese do benzotiazole como anteriormente descrito. O grupo  $R_2$  refere-se a um dos substituintes do grupo OH do ácido cafeico, que pode ser um grupo metilo ou simplesmente um átomo de hidrogénio, mantendo-se o grupo OH livre. A denominação AA refere-se ao aminoácido usado como espaçador ou então a uma outra entidade química, como é o caso do ácido 4-aminofenilacético dos compostos **6** e **9**.

**Tabela 3.** Resultados dos ensaios de inibição enzimática e da capacidade antioxidante dos compostos desenvolvidos (1–9) e compostos de comparação, tal como algumas propriedades farmacocinéticas

Inibidor <sup>a</sup>	AA <sup>b</sup>	X-R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (μM) AChE	EC <sub>50</sub> (μM) DPPH <sup>c</sup>	clog P <sup>d, e</sup>	log BB <sup>d, f</sup>
<b>1</b>	Gly	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	79.7 ± 1.2	1.13 mM	4.19	-0.56
<b>2</b>	β-Ala	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	54.3 ± 2.7	36% (2.17 mM)	4.51	-0.58
<b>3</b>	L-Ala	(S)CH-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	99.0 ± 3.0	5.2% (0.57mM)	4.51	-0.44
<b>4</b>	D-Ala	(R)CH-CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	69.3 ± 3.0	18% (1.2 mM)	4.51	-0.44
<b>5</b>	D-Val	(R)CH- <i>i</i> -Pr	CH <sub>3</sub>	53.0 ± 1.5	13% (0.9 mM)	4.99	-0.43
<b>6</b>	APA		CH <sub>3</sub>	25.5 ± 1.5	20% (0.5 mM) 0.50 mM	5.79	-0.58
<b>7</b>	β-Ala	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	H	123 ± 10	61.6 ± 2.0	3.63	-1.30
<b>8</b>	L-Ala	(S)CH-CH <sub>3</sub>	H	163.0 ± 1.9	46.4 ± 1.4	3.63	-1.15
<b>9</b>	APA		H	11.7 ± 0.6	41.4 ± 0.5	4.88	-1.33
<b>Donepezil<sup>g</sup></b>				0.03		4.46	0.13
<b>ADMC<sup>h</sup></b>					480	2.20	-0.72
<b>Ácido Ferúlico<sup>h</sup></b>					24.7	1.34	-1.14



Com base nos valores de inibição apresentados na tabela acima é possível fazer a análise da relação estrutura/actividade (SAR). Verifica-se que os compostos desenvolvidos apresentam, de uma forma geral, actividades de inibição moderadas, com  $IC_{50}$  na ordem das dezenas e centena de micromolar. Os compostos que apresentaram melhores resultados são o **6** e o **9**, com  $IC_{50}$  de 25.5 e 11.7  $\mu$ M respectivamente. Na mesma ordem de grandeza, no que diz respeito à inibição, encontram-se os compostos **2** e **5**. Estes valores podem ser explicados pelas diferenças entre os diversos espaçadores e respectivos substituintes dos compostos desenvolvidos. Os compostos **6** e do **9** apresentam como espaçador um grupo químico volumoso, derivado do acoplamento com o ácido 4-aminofenilacético (APA). Este resultado mostra que a presença deste grupo lipofílico, faz com que a capacidade inibitória aumente. Uma possível explicação para tal facto reside nas interacções do tipo  $\pi$ - $\pi$  (*stacking*) estabelecidas entre os anéis aromáticos dos compostos **6** e **9** e os anéis de resíduos aromáticos da garganta catalítica do centro activo do AChE. A maior capacidade inibitória destes dois compostos pode dever-se também ao seu tamanho global e logo a possibilidade de estabelecerem interacções com resíduos do sítio aniónico periférico (PAS) do enzima. Como descrito anteriormente, o PAS participa no primeiro passo no mecanismo de hidrólise da ACh, levada a cabo pelo enzima. Há evidências de que a acetilcolina poderá ligar-se ao resíduo de Asp74 do PAS no primeiro passo da hidrólise <sup>6</sup>. A presença dos anéis aromáticos faz com que a nuvem electrónica associada à molécula seja maior e consequentemente, a probabilidade de haver múltiplas interacções enzima-ligando será também maior. Os compostos **7** e **8**, ao contrário do que se estava à espera, apresentaram resultados de inibição menos satisfatórios, 123 e 163  $\mu$ M respectivamente. Analisando os resultados dos seus análogos, **2** e **3**, conclui-se que a dupla metilação do ácido cafeico nas posições orto e meta facilita a inibição. Este resultado parece um tanto ou quanto contraditório, na medida em que a presença de um grupo OH livre nos compostos **7** e **8** poderia conferir uma certa polaridade à molécula e consequentemente possíveis ligações por pontes de hidrogénio entre o inibidor e os resíduos da tríade catalítica do centro activo ou do PAS. O tipo de derivado benzotiazole presente na molécula, também influencia o  $IC_{50}$  do inibidor. No caso específico dos inibidores **2**, **5** e **6**, cujos espaçadores são a  $\beta$ -alanina, D-valina e APA, respectivamente, o comprimento destes, em termos de cadeia alifática, é maior do que os dos outros compostos, favorecendo a interacção com o PAS do enzima (composto **6** em particular). A

diferença de  $IC_{50}$  entre os compostos **7** – **9** centra-se exclusivamente no efeito que o grupo espaçador acoplado ao ácido ferúlico tem no mecanismo global de acção da molécula. A vantagem do composto **9** sobre o **7** e o **8** parece estar no seu mecanismo de inibição. Uma forma de inferir sobre essa seria fazer outros estudos de cinética enzimática de modo a determinar o carácter de inibição, através das respectivas constantes de inibição, bem como das velocidades aparentes ( $V^{app}$ ) e das constantes de velocidade aparentes ( $k^{app}$ ). De referir que os valores de inibição obtidos para os compostos desenvolvidos neste projecto, ficam aquém dos apresentados pelo donepezil, que é um dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer.<sup>85</sup>

Através de ferramentas computacionais (QikProp, versão 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2005) fez-se a previsão dos coeficientes de partição octanol-água ( $\log P$ ) e cérebro-sangue ( $\log BB$ ) dos compostos. Em relação ao  $\log P$  todos apresentam valores dentro dos aceitáveis, o que nos leva a crer que uma vez no organismo, poderão ultrapassar a barreira hematoencefálica com alguma facilidade. Esta conclusão é corroborada pelos valores de  $\log P$  dos compostos em estudo e o do donepezil (4.46). Quanto aos valores de  $\log BB$ , estes também estão próximos do do donepezil (0.13), indicando assim alguma predominância do inibidor no cérebro em relação ao sangue, aumentando assim o efeito do fármaco no sistema colinérgico. De um modo geral, os inibidores desenvolvidos neste trabalho não apresentam resultados favoráveis em relação ao tratamento da doença de Alzheimer. Outros tipos de estudo seriam necessários não só com o AChE mas também com o butirilcolinesterase (BuChE). Dessa forma seria possível inferir sobre a seletividade dos inibidores para com os 2 enzimas e consequentemente seguir estratégias *multi-target*. Outra alternativa a seguir seria, a partir do composto **9**, desenhar novos inibidores com o objectivo de melhorar a sua capacidade inibitória do AChE. Possíveis derivatizações de **9** passariam por inserir grupos químicos polares (ex. OH,  $NH_2$ ) e/ou novos grupos aromáticos que possam interagir com o PAS do enzima de uma forma mais eficaz.

## **2.8. Estudos da capacidade antioxidante**

Como já foi referido, um dos objectivos do projecto era o desenvolvimento de inibidores bi-funcionais, ou seja que tivessem capacidade de inibir o enzima AChE, mas também que apresentassem alguma capacidade de redução de radicais livres ou seja de antioxidante. Actualmente, dada a importância dos antioxidantes, a investigação científica tem aumentado exponencialmente com vista à procura de novos e melhores princípios activos (naturais ou sintéticos) que possam proteger o corpo humano dos efeitos drásticos dos radicais livres. No caso específico, prevenir os efeitos daqueles no sistema nervoso central (CNS). Assim, os métodos desenvolvidos para a determinação da capacidade antioxidante também têm aumentado paralelamente. Neste projecto seguiu-se o método desenvolvido por Marsden Blois (Universidade de Stanford) em meados da década de cinquenta.<sup>8,79</sup>

### **2.8.1. Considerações sobre o método e substratos usados**

Na realização dos ensaios da capacidade antioxidante, foi seguida a reacção de extinção do radical estável do difenilpicrilhidrazil (DPHH), levada a cabo pelos inibidores desenvolvidos. O DPPH só é estável na forma de radical (**1** – Figura 10). Isto acontece pelo facto de haver a deslocalização do electrão livre pela molécula como um todo, evitando assim a dimerização, fenómeno que acontece muitas vezes em moléculas com radicais livres. A deslocalização da carga faz com que o DPPH apresente uma cor violeta/roxa, caracterizado pelo pico de absorção a  $\lambda$  igual a 517 nm, em metanol. Dessa forma, quando este é misturado a uma substância que consegue doar um átomo de hidrogénio, dá origem a forma reduzida (**2**) e consequente decréscimo da absorvência a 517 nm. A forma reduzida apresenta uma cor amarelada que advém do grupo picril (a azul) presente.<sup>8,11,79</sup>



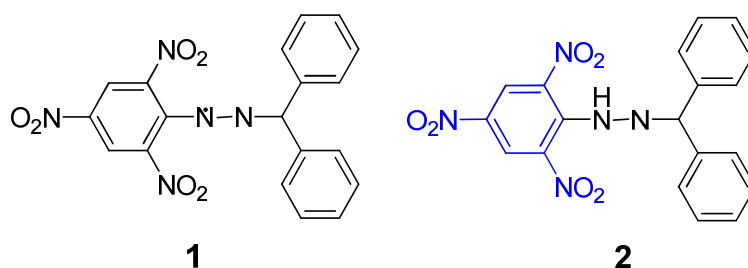


Figura 10: Estruturas químicas do radical estável (1) e da forma reduzida (2) do DPPH. A azul destaca-se o grupo picril que confere a cor amarela á forma reduzida

Representando o radical estável do DPPH como  $\dot{\mathbf{Z}}$  e a molécula dadora por  $\mathbf{AH}$ , a reacção que se dá pode ser esquematizada da seguinte forma:



onde, o  $\mathbf{ZH}$  é a forma reduzida e  $\dot{\mathbf{A}}$  é o radical do antioxidante em estudo. O radical do DPPH representa neste caso possíveis ROS ou NOS no organismo cuja actividade se pretende suprimir através do composto  $\mathbf{AH}$ .

O método de Marsden Blois sofreu ao longo dos últimos anos algumas modificações mas, continua a ser um dos melhores ou quiçá o melhor método para a determinação da capacidade antioxidante de compostos naturais ou sintéticos<sup>8,79</sup>. Dessa forma, dentro do âmbito do presente projecto, seguiu-se este método para inferir sobre a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados, com particular atenção para os derivados do acoplamento dos BTA com o ácido ferúlico (7–9). Estes deverão apresentar maior capacidade antioxidante, pela presença de um grupo OH livre no derivado do ácido cafeico.

### 2.8.2. Resultados da capacidade antioxidante

A determinação dos valores de  $EC_{50}$  dos compostos desenvolvidos foi feita de acordo com<sup>12</sup>. Procedeu-se de um modo idêntico ao usado na determinação dos  $IC_{50}$  dos compostos em relação à sua actividade anti-AChE. Os valores obtidos foram tratados tendo em conta a equação 2, ou seja:

$$\frac{Abs_{Branco}}{Abs_{Ensaio}} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{EC_{50}}} \quad \text{Equação 2}$$

em que, à semelhança da equação 1,  $Abs_{Branco}$  é a absorvência da solução do radical estável do DPPH<sup>•</sup> na ausência do inibidor,  $Abs_{Ensaio}$  é a absorvência da solução de DPPH na presença do composto, [I] é a concentração do inibidor. Linearizando a equação e representando graficamente a percentagem de extinção  $(1-Abs_{Branco}/Abs_{Ensaio})$  em função da concentração de inibidor **9**, obtém-se um gráfico do tipo:

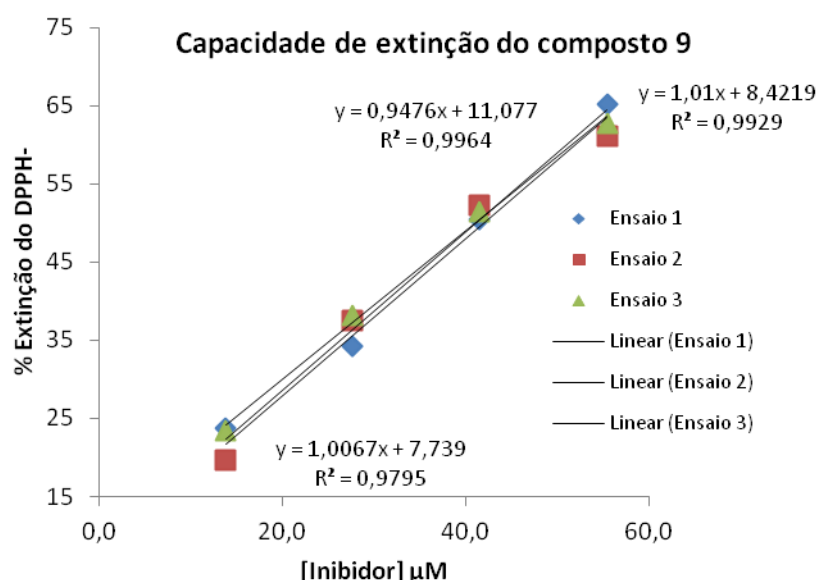


Figura 11: Gráfico da percentagem de extinção do radical estável do DPPH em função da concentração do composto **9**, e respectivas retas de regressão linear

Tabela 4: Perfil da capacidade antioxidante em relação ao DPPH do composto **9** baseado na experiência anteriormente descrita

DPPH	Concentração de inibidor (µM)				EC <sub>50</sub> (µM)
	14	28	42	55	
% Radical (DPPH <sup>•</sup> )	77	64	49	37	41.4 ± 0.5
% Extinção	23	36	51	63	

Na Figura 11 e Tabela 4 estão representados os resultados da capacidade antioxidante do composto **9** e respectivo valor de EC<sub>50</sub>. Procedeu-se de igual forma para os outros compostos desenvolvidos (**1-8**), sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 4, possibilitando assim uma análise quantitativa e estrutural. Estes ensaios, à semelhança dos conduzidos para IC<sub>50</sub>, permitiu-nos fazer uma melhor caracterização dos compostos

desenvolvidos no que concerne à sua capacidade de doar prótons quando em presença de um radical ou na melhor das hipóteses na presença de uma espécie reativa de oxigénio. Observa-se que o composto **9** apresenta a melhor capacidade antioxidante com um EC<sub>50</sub> de 41.4 ± 0.5 µM, seguido do **7** e do **8** com EC<sub>50</sub> de 61.6 ± 2 e 46.4 ± 1.4 µM respectivamente. Isto deve-se obviamente ao tipo de ácido usado para acoplar ao derivado benzotiazole. Nos compostos de **1** a **6** acoplou-se à amina derivada do BTA, o ácido dimetoxicinâmico (ADMC) (ver: estratégia de síntese deste capítulo), o que faz diminuir consideravelmente o valor do EC<sub>50</sub> em comparação com **7**, **8** e **9**. Nestes casos, o grupo hidroxilo do ácido ferúlico parece ser o responsável pela diminuição dos valores de EC<sub>50</sub> e consequentemente do aumento das propriedades antioxidantes dos compostos referidos. Analisando os EC<sub>50</sub> dos compostos **2**, **3**, **4**, **5**, **6** conclui-se a sua menor capacidade de redução de radicais livres, facto evidenciado pelos altos valores de EC<sub>50</sub> (na ordem dos mM). A diferença entre a capacidade de antioxidante é evidenciada também nos respectivos valores, 480 µM e 24.7 µM para o ácido dimetoxicinâmico e ferúlico respectivamente. As diferenças entre os compostos com ácido ferúlico (**7**, **8** e **9**) podem dever-se à maior estabilidade do composto **9** na sua forma reduzida e também pela deslocalização de carga pelos anéis aromáticos. Quanto a possíveis estratégias a seguir com vista ao aumento da capacidade antioxidante destes compostos, passaria pelo acoplamento de um outro tipo de ácido (com grupos OH livres) ou então do próprio ácido cafeico, que possui na sua estrutura dois grupos OH livres. De referir que aquando da síntese dos compostos, não se conseguiu acoplar o ácido cafeico a nenhum dos derivados benzotiazole dos aminoácidos (facto explicado na estratégia de síntese dos compostos). A possível substituição do ácido a acoplar deverá obviamente ser acompanhada de outros estudos de *docking* e inibição enzimática de modo a conjugar as diversas variáveis inerentes, como sendo o IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>, log P e log BB, entre outras.

## 2.9. Modelação molecular

Pretende-se, neste subcapítulo, compreender os resultados obtidos para os ensaios de inibição do AChE, à luz dos resultados na simulação teórica de *docking* efectuados para os compostos desenvolvidos, a qual foi fundamental na primeira etapa do *design* molecular dos mesmos. Analisando as conformações dos diversos inibidores dentro do enzima e estudando as diversas interacções ligando-proteína estabelecidas, é possível inferir sobre as actividades de inibição relativas dos vários compostos. Como receptor para estes cálculos de *docking* (a proteína) foi usada a estrutura cristalina com o código 1EVE do RCSB Protein Data Banc (PDB)<sup>28</sup>. Esta corresponde ao complexo da TcAChE com o donepezil (Dnp), e foi escolhida pelo facto deste ligando ter várias analogias estruturais com os nossos inibidores (tal como mencionado anteriormente), e por isso termos, à partida, uma conformação da enzima bastante próxima da que existirá no aducto com os inibidores desenhados, em termos da posição das cadeias laterais dos vários resíduos que formam o centro catalítico.

Na **figura 10** está representado o modelo do Dnp original sobreposto com o do composto **1**. É possível observar que o grupo BTA de **1** ocupa a mesma posição do anel aromático do grupo benzilo do Dnp, e como tal parece formar o mesmo tipo de interacções  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo Trp84 do CAS. Por outro lado, enquanto o anel piperidínico do Dnp forma consideráveis interacções lipofílicas com a região aromática Phe330-Tyr334, em **1** a cadeia espaçadora entre os grupos BTA e dimetoxibenzeno forma apenas interacções mínimas nesta região, sendo a superfície de contacto com o enzima bastante mais reduzida do que no caso do Dnp. Quanto ao grupo dimetoxibenzeno de **1**, este tem uma elevada sobreposição espacial com o grupo semelhante do Dnp (neste caso, o grupo 5,6-dimetoxi-1-indanonilo). No entanto, como se observa na **figura 12**, este grupo ocupa uma posição ligeiramente mais exterior da cavidade catalítica, interagindo mais com a região aromática do PAS (Tyr70, Trp279) do que no caso do composto **1**. Mediante esta análise se compreende que a afinidade do Dnp pelo AChE seja bastante superior à de **1**, e como tal tenha revelado também uma actividade inibitória superior (valores de IC<sub>50</sub> de 30 nM vs. 80  $\mu$ M, respectivamente).

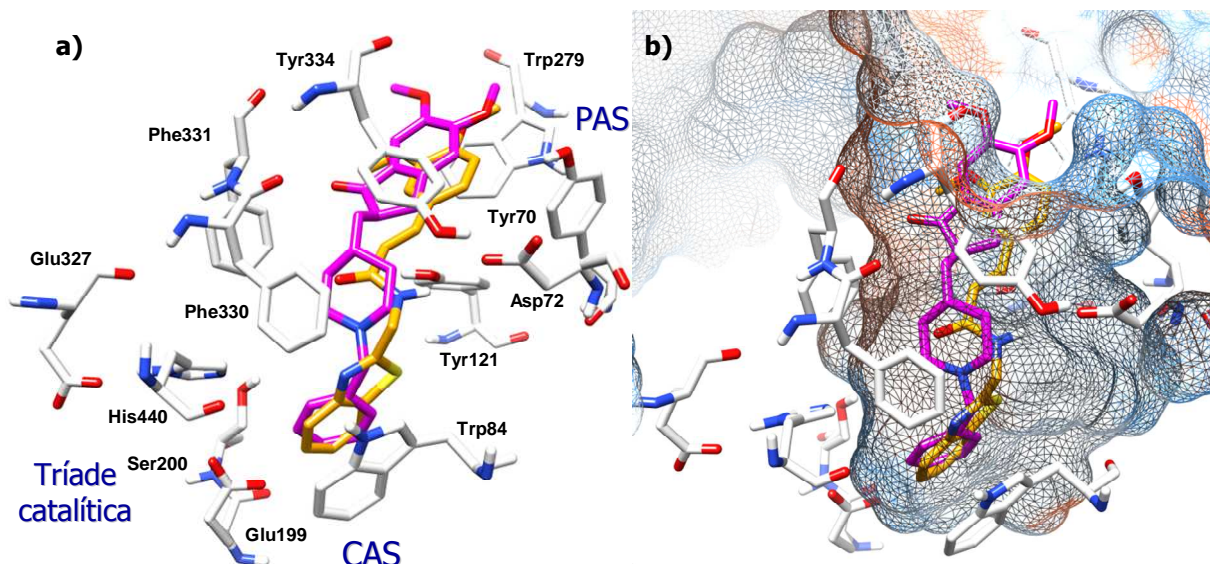


Figura 12: Resultado de *docking* do composto **1** (laranja) no AChE, sobreposto com o Dnp (magenta) na sua posição original (a); a superfície de malha (b) representa um corte transversal na garganta catalítica, sendo as regiões azuis hidrófilas, e as vermelhas hidrófobas. Fazem parte da tríade catalítica os resíduos S200, E327, H440; do CAS os resíduos W84, F330, E199; do PAS os resíduos Y70, D72, W279

Considerando agora os restantes compostos derivados dos vários isómeros da alanina (**2–4**) com o (melhor dizer o que é) (ADMC), os estudos de *docking* mostraram conformações de ligação ao enzima diferentes entre si. Na figura 11 pode observar-se estes diferentes compostos, comparados com o inibidor **1**. Entre o conjunto dos compostos estudados, o inibidor **2**, derivado da  $\beta$ -alanina (Figura 13 - a), é o que apresenta um comportamento mais diferenciado, ocupando uma posição menos inserida na garganta catalítica do que os outros. No entanto, o grupo BTA apresenta também interações aromáticas, não com o Trp84, como no caso de **1**, mas com a Phe330. Por outro lado, o grupo NH-amida parece formar uma ponte de hidrogénio com o grupo PhOH do resíduo Tyr121, aumentando bastante a força da interação inibidor-enzima. O grupo 3,4-dimetoxibenzene de **2** situa-se sobre o PAS, numa parte mais externa da cavidade do que **1**, sendo aparentemente as interações aromáticas nesta região mais intensas do que no caso anterior. Quanto aos compostos **3** e **4** (Figura 13 - b), as suas posições no centro activo do enzima são bastante semelhantes à de **1**. O composto **4** apresenta-se quase totalmente sobreposto ao **1**, e por isso forma o mesmo tipo de

interacções, mais aquelas estabelecidas pelo grupo lateral metilo ( $R_1 = (R)CH_3$ ) que, sendo apolar, estabelece ligações de Van Der Waals favoráveis com os resíduos hidrófobos da cavidade; esse facto permitindo explicar um aumento da actividade inibitória de **4**, relativamente a **1** ( $IC_{50}$  de 69 e 80  $\mu M$ , respectivamente). No caso do inibidor **3**, este apresenta o grupo metilo na direcção da Phe330, o que provoca um desvio da estrutura total relativamente à sua posição preferencial (tal como em **1**), originando uma penalização energética na estabilidade do complexo AChE-**3**, sendo por isso de esperar o decréscimo da sua actividade inibitória ( $IC_{50}$  passou de 80  $\mu M$  em **1**, para 99  $\mu M$  em **3**). O resultado de *docking* para o composto **5**, derivado da D-valina, é em tudo semelhante ao de **4**, estando o substituinte isopropilo ( $R_1 = (R)i\text{-Pr}$ ) na mesma posição do grupo metilo daquele composto. Uma vez que esta zona hidrófoba da cavidade catalítica tem espaço suficiente para acomodar um grupo do tamanho do *i*-Pr, este forma interacções de van der Waals favoráveis com o enzima, o que torna este inibidor mais activo do que **1** ( $IC_{50}$  de 53  $\mu M$ ).

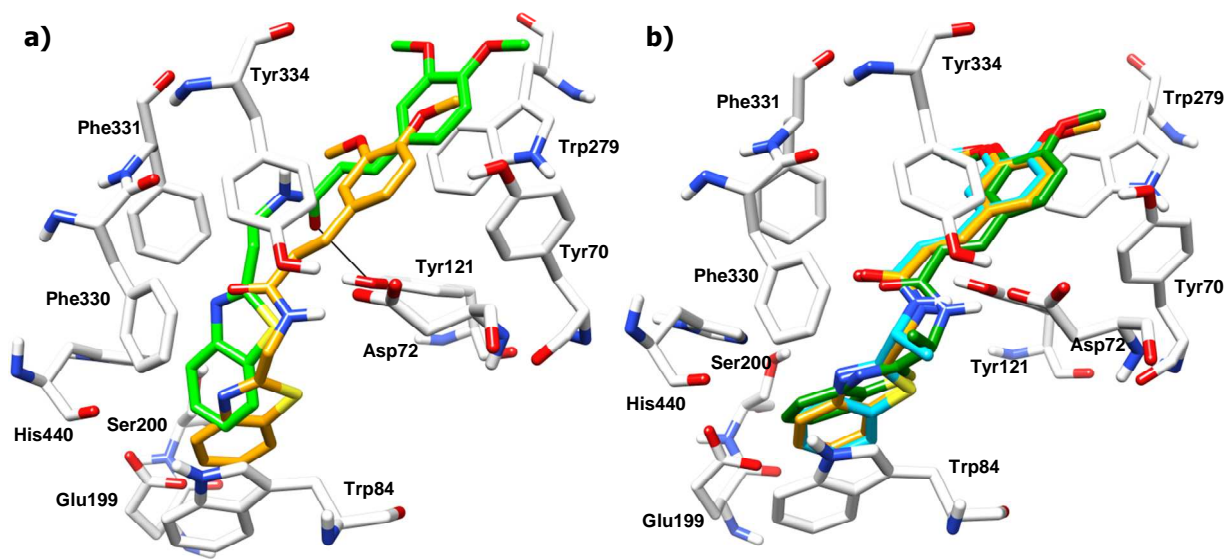


Figura 13: Resultados de *docking* do composto **1** (laraja) no AChE, sobreposto com **2** (verde) (a), e com **3** (verde escuro) e **4** (ciano) (b).

O composto **6**, derivado de um outro tipo de aminoácido (APA), tem um espaçador aromático ( $CH_2Ph$ ) entre os grupos BTA e o dimetoxicinâmico, e forma por isso outro



tipo de interações com o AChE. Neste caso, o grupo BTA não ocupa exactamente a mesma posição que no caso de **1**, mas continua a formar interações  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo Trp84, embora menos intensas (Figura 14 - **a**). No entanto, prevê-se que o ligando tenha liberdade para se mover de forma a permitir um contacto mais próximo, enquanto que o grupo fenilo do espaçador poderá formar fortes interações aromáticas com três dos resíduos da cavidade catalítica, Phe330, Phe331 e Tyr334. O grupo dimetoxicinâmico, por outro lado, apresenta-se bastante mais exterior do que nos inibidores anteriores, interagindo mais fortemente com os grupos aromáticos do PAS. Estas características explicam que seja este o inibidor mais forte do AChE, dentro da série contendo o segmento dimetoxicinâmico.

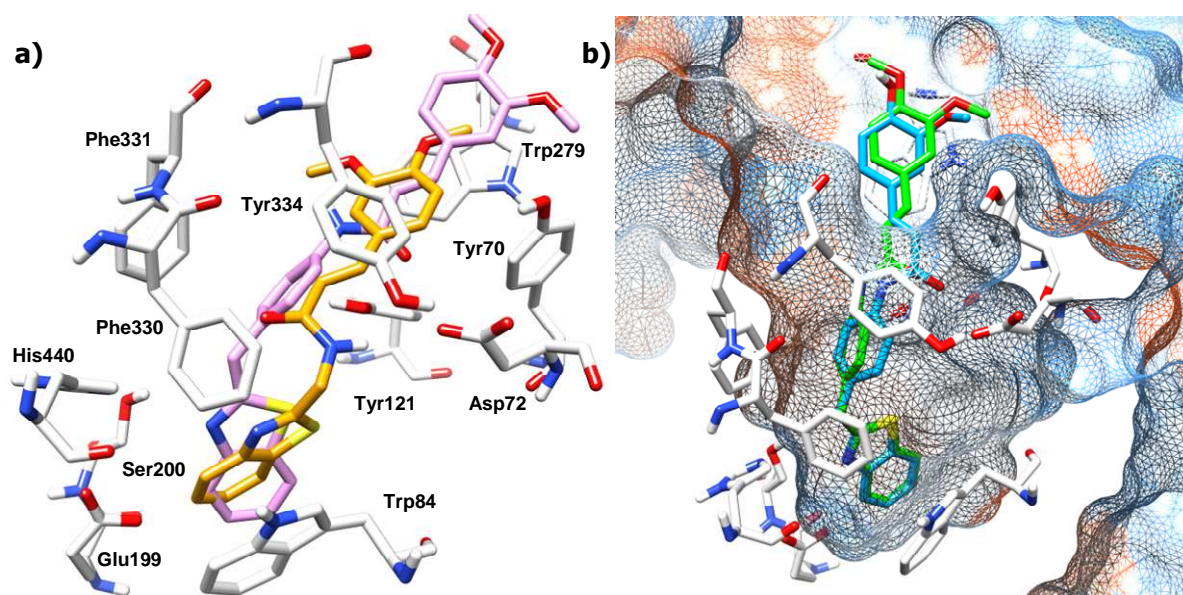


Figura 14: Resultados de *docking* de **6** (rosa) no AChE, sobreposto com **1** (laranja) (**a**), e **9** (azul) (**b**); superfícies azuis representam zonas hidrófilas do enzima, e vermelhas zonas hidrófobas.

Dirigindo a nossa atenção à série derivada do ácido ferúlico, os estudos de *docking* mostraram que as estruturas dos compostos **7**, **8** e **9** aparecem perfeitamente sobrepostos às de **2**, **3** e **6**, respectivamente. Contudo, uma vez que o grupo cinâmico de **2** e **3** interacciona com uma região muito hidrófoba do enzima, a substituição do grupo metóxido por um hidroxilo é desfavorável para a estabilidade do complexo enzima-

inibidor, de forma que os compostos **7** e **8** são inibidores mais fracos do que os seus homólogos. O composto **6**, por outro lado, apresenta o grupo cinâmico numa zona mais externa do enzima, e por isso mais exposto ao solvente (Figura 14). Dessa forma, a substituição do grupo 4-metóxido (em **6**) por um hidroxilo (em **9**) revela-se favorável, uma vez que o ligando passa a interactuar com as moléculas de água, sem que a interacção com os resíduos da proteína diminuam. Este facto traduz-se numa elevada capacidade inibitória do composto **9**, relativamente a todos os restantes inibidores estudados, sendo este o composto mais activo ( $IC_{50}$  de 12  $\mu M$ ).

## 2.10. Propriedades farmacocinéticas

De forma a analisar ainda mais detalhadamente dos novos compostos, previu-se também alguns indicadores dos seus perfis farmacológicos. Recorreu-se a métodos *in silico* de previsão de algumas propriedades fármaco-cinéticas dos compostos, nomeadamente para calcular os coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) e o coeficiente de partição cérebro/sangue ( $\log BB$ ) dos compostos em estudo. Os compostos, previamente desenhados no programa Maestro e minimizados com o Macromodel, tal como descrito para o *docking*, foram submetidos ao cálculo das propriedades farmacocinéticas usando o programa QikProp versão 2.5<sup>83</sup>. O programa assume que os compostos são de toma oral e que não há transporte activo destes<sup>84</sup>. Pelos resultados da tabela 4, conclui-se que todos os compostos apresentam coeficiente octanol/água ( $\log PP$ ) inferior a 6.5, que é o valor máximo aceitável. Embora os resultados obtidos estejam compreendidos no intervalo de -2 a 6.5, os mesmos são considerados elevados do ponto de vista farmacocinético. Tais valores e tendo em conta os intervalos teóricos, poderão dificultar sobremaneira o transporte pela corrente sanguínea. As massas dos compostos estão conforme os limites teóricos, que neste caso é de 500g/mol. Os valores de  $\log BB$  são negativos, como esperado, o que evidência uma boa permeabilidade em relação à barreira hematoencefálica. Todos os valores estão compreendidos no intervalo de -3 a 1.2, onde o -3 é considerado excelente e 1.2 um resultado pouco ou nada satisfatório<sup>19</sup>. Os resultados obtidos para a permeabilidade da barreira hematoencefálica e para a permeabilidade tracto-intestinal – sangue indicam que os compostos sintetizados são candidatos a fármacos de toma oral, embora apresentam lipofilicidade elevada, justificada pela sua estrutura química.



## 2.11. Conclusões

Os resultados obtidos neste projecto demonstraram que, com o auxílio de métodos computacionais de *design*, é possível desenvolver inibidores eficientes do acetilcolinesterase (AChE), e simultaneamente possuir outras propriedades (nomeadamente antioxidantes) que podem desacelerar a evolução da doença de Alzheimer (DA). De acordo com a estratégia do trabalho, optou-se por desenvolver compostos com uma estrutura base contendo a função benzotiazóico (BTA) que poderá reconhecer o péptido  $\beta$ -amilóide, e um grupo derivado do ácido cafeico que confere propriedades antioxidantes (eg. dimetoxicinâmico e ferúlico), ligados através de um grupo espaçador. Partindo daquela estrutura, foi possível efetuar modificações específicas, de forma a obter compostos com características bioquímicas e farmacocinéticas diferentes. O grupo espaçador corresponde ao bloco molecular do aminoácido de partida, usado na síntese de cada composto, e dessa forma foram introduzidas as variações no comprimento, lipofilicidade, tamanho e natureza química global dos inibidores preparados. O estudo de inibição enzimática com o AChE revelou actividades na ordem micromolar para os compostos desenvolvidos, sendo o composto **9** o mais activo ( $IC_{50}$  de 11.7  $\mu$ M). Os estudos de modelação molecular efectuados demonstram que estes compostos apresentam algumas semelhanças com o donepezil, no que diz respeito às interacções com o centro activo do enzima. Demonstraram também que os compostos **6** e **9**, dadas as suas características estruturais, podem impedir a ligação da acetilcolina ao PAS, no primeiro passo da hidrólise enzimática. Estes compostos podem também estabelecer interacções  $\pi$ - $\pi$  com vários dos resíduos aromáticos que formam a garganta catalítica, nomeadamente o CAS, podendo assim bloquear totalmente a entrada da acetilcolina no centro activo do AChE, e impedir eficazmente a sua acção catalítica. Demonstrou-se que estes compostos poderão ser úteis no desenvolvimento de novos inibidores do AChE, na medida em que será possível efetuar modificações racionais com o intuito de otimizar mais ainda a sua interação com o centro activo do enzima, e consequentemente melhorar a sua actividade inibitória. Em relação aos resultados da capacidade antioxidante, como já seria de esperar, os compostos derivados do ácido ferúlico (que é um derivado fenólico com um grupo OH livre) apresentaram actividades antioxidantes mais elevadas, em relação à extinção do radical DPPH. Os compostos **8** e **9** apresentaram os melhores valores de

EC<sub>50</sub>, com 46.4 e 41.4  $\mu$ M, respectivamente. Para melhor compreender os mecanismos de inibição dos compostos desenvolvidos e a sua efectiva acção biológica, ter-se-ia que fazer outros estudos de cinética enzimática e determinar outros parâmetros de inibição inerentes aos novos compostos (eg. constantes de inibição, tipo de inibição, etc). Um estudo interessante seria inferir sobre a capacidade que estes têm de inibir a ligação do péptido  $\beta$ -amilóide ao AChE, e consequentemente avaliar a sua contribuição para reduzir os agregados  $\beta$ -amilóide através desta via. Outra sugestão é ainda variar os grupos antioxidantes da estrutura geral dos compostos, que possam ser mais activos do que os grupos aqui testados, e simultaneamente, fornecer interacções favoráveis com o AChE (eg. trolox). Conclui-se, portanto, que o propósito do presente projecto foi alcançado, e que se conseguiu lançar as bases necessárias para o desenvolvimento de novos inibidores do AChE mais potentes do que aqueles aqui apresentados. Como propostas de estratégias a seguir no desenvolvimento de fármacos para o tratamento paliativo da doença de Alzheimer, convém salientar os seguintes: Tendo em conta as características multi-factoriais da DA, poder-se-á adoptar uma estratégia *multi-target* e abandonar gradualmente a visão *single molecule – single target*. Desenvolver compostos com actividade inibitória do AChE e que possam, simultaneamente, impedir a agregação A $\beta$ , é uma dessas estratégias. Outra passa pelo estímulo à expressão de receptores nicotínicos e muscarínicos de forma a compensar o défice de neurotransmissão no sistema colinérgico.

Muitas dessas estratégias dependem obviamente da elucidação do mecanismo bioquímico completo da DA e só a partir daí conseguir-se-á traçar formas eficazes e altamente potentes de combate a esta doença neurodegenerativa.

### 3. Parte experimental

#### 3.1. Modelação molecular

Para proceder à modelação molecular, obteve-se a estrutura de raios-X do AChE a partir do RCSB Protein Data Bank (PDB) <sup>28</sup>. O código PDB da estrutura usada foi o 1EVE, que corresponde à variante de *torpedo californica* complexada com o inibidor donepezil (Dnp). Esta estrutura foi escolhida pelo facto do seu ligando (Dnp) apresentar semelhanças estruturais com os compostos aqui desenvolvidos, tal como descrito na estratégia de síntese.

As moléculas de solvente e dos auxiliares de cristalização (*N*-acetil-*D*-glucosamina) foram removidas da estrutura original, e os átomos de hidrogénio foram adicionados, através do programa Maestro, versão 7.5 <sup>86</sup>. O ligando original foi extraído do complexo, e as duas estruturas foram guardadas separadamente. Os ligandos foram desenhados usando o Maestro, e foram submetidos a uma busca conformacional de 1000 ciclos, usando um modelo de solvente implícito de água (modelo generalizado de superfície/área de Born), através do Macromodel <sup>81</sup>. O algoritmo utilizado baseou-se no método de Monte Carlo, com o campo de forças de Merck (MMFF) e uma constante dieléctrica dependente da distância, com o valor de 1.0. A conformação de menor energia foi posteriormente submetida aos cálculos de *docking* com a estrutura do enzima AChE, previamente guardada, usando o programa GOLD, versão 4.0 <sup>82</sup>. A região de interesse foi definida como a zona da proteína dentro de um raio de 15 Å em torno do ligando original (Dnp). Usaram-se os parâmetros pré-definidos do Gold e foram efectuados 100 ciclos de algoritmo genético. A função score ASP foi usada nestes cálculos, uma vez que esta já demonstrou anteriormente ser a melhor para prever as interacções enzima – ligando em casos de inibição da AChE, em comparação com as outras disponibilizadas pelo Gold (GoldScore e ChemScore) <sup>88</sup>. Para cada um dos ligandos, o resultado de *docking* tido em consideração foi aquele cuja solução apresentou melhor valor de score, de acordo com a função ASP.

### 3.2. Previsão das propriedades farmacocinéticas

Recorreu-se a métodos *in silico* de previsão de algumas propriedades fármaco-cinéticas dos compostos, nomeadamente para calcular os coeficiente de partição octanol/água ( $\log P$ ) e o coeficiente de partição cérebro/sangue ( $\log BB$ ) dos compostos em estudo. Os compostos, previamente desenhados no programa Maestro e minimizados com o Macromodel, tal como descrito para o *docking*, foram submetidos ao cálculo das propriedades farmacocinéticas usando o programa QikProp , versão 2.5.<sup>83</sup> O programa assume que os compostos são de toma oral e que não há transporte activo destes.<sup>84</sup>

### 3.3. Síntese dos compostos

#### 3.3.1. Reagentes e instrumentação

Os reagentes utilizados na síntese dos compostos foram adquiridos a um fornecedor, como a Sigma-Aldrich, Fluka e Merck, apresentando grau de pureza analítico. Estes foram utilizados sem nenhuma purificação adicional. Os solventes utilizados foram também adquiridos à Sigma-Aldrich, Fluka ou Merck. Em alguns casos, foram secos antes do seu uso, de acordo com os métodos de purificação usados no laboratório <sup>85</sup>. As reacções químicas foram seguidas por técnicas cromatográficas presentes em laboratórios de química orgânica, como a cromatografia em camada fina (TCL) (placas de alumínio revestidos com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). As manchas foram geralmente identificadas com luz UV e em alguns casos foram reveladas com a solução “dragendorff”, quando estavam presentes aminas quaternárias ou aromáticas, ou uma solução de ninidrina, para revelar a presença de aminoácidos. Os pontos de fusão dos compostos obtidos foram medidos usando um microscópio Leica Gallen III, e são não corrigidos. Para a caracterização estrutural, traçaram-se os espectros de ressonância magnética nuclear de protão (<sup>1</sup>H-NMR), recorrendo aos espectrómetros Bruker Avance 300 ou Bruker Avance 30, a 25 °C. Os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm, em relação às referências internas padrão, como o tetrametilsilano (TMS) para solventes orgânicos, ou 3-(trimetilsililo)-[2,2,3,3-d<sub>4</sub>]-propionato de sódio (DSS) para soluções aquosas deuteradas. Para complementar as informações estruturais obtidas através dos espectros de <sup>1</sup>H-NMR, traçou-se também os espectros de <sup>13</sup>C-NMR para alguns dos compostos, utilizando um espectrómetro Bruker Avance 400, a 25 °C. Na análise dos espectros de NMR usou-se a seguinte terminologia: s – singuleto, d – duplete, t – tripleto, qd – quadruplete, qt – quintuplete, m – multiplete, sa – singuleto alargado, 2d – dois dupletos sobrepostos, 2t – dois tripletos sobrepostos. Com vista ainda à caracterização estrutural dos compostos, traçaram-se os respectivos espectros de massa (ionização por electrospray, ESI MS) dos mesmos, através de um espectrómetro 500 MS LC Ion Trap (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray.

### 3.3.2. Síntese dos derivados benzotiazole dos aminoácidos

#### 3.3.2.1. 2 - (Benzotiazol-2-il)metil-etanamina (1a)

Uma mistura de aminotiofenol (1.54 mL, 14.3 mmol) com hidrocloreto do éster de etilglicina (1.51 g, 14.3 mmol), em ácido poli-fosfórico (10 g), foi deixada a reagir a 220 °C, sob refluxo durante 5 h. Ao óleo resultante foi posteriormente adicionado numa solução aquosa de NaOH 5M (ca. 200 mL), obtendo uma solução básica de tom amarelado. Procedeu-se à extracção do produto obtido com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 25 mL). Da fase orgânica resultante foi extraído o produto com uma solução aquosa de HCl 0.1 M (4 × 20 mL). Lavou-se a fase aquosa com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × 10 mL) de modo a retirar impurezas. Aumentou-se o pH da fase aquosa para ca. 10 com adição de uma solução de NaOH 2.5 M, e extraiu-se o produto com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × 15 mL). A fase orgânica resultante foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um óleo viscoso amarelado, que foi posteriormente acidificado com metanol saturado com HCl. Evaporou-se novamente o solvente, recristalizou-se o sólido com CH<sub>3</sub>CN. Obteve-se um sólido amarelado, que foi levado a secar sob vácuo, correspondendo ao sal hidrocloreto do composto pretendido (1.52 g, rendimento de 53.2%). <sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.10 (d, 2H, 4,7-BTAH), 7.65-7.57 (2H, 5,6-BTAH), 4.73 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); m/z (ESI MS): 165.0 (M + H)<sup>+</sup>.

#### 3.3.2.2. 2-(Benzotiazol-2-il)etanamina (2a)

Para a síntese do derivado benzotiazole da β-alanina, procedeu-se da mesma forma que em **1a**, usando a β-alanina como reagente (espaçador) em vez do éster da glicina. Seguindo os mesmos passos de purificação atrás descritos, obteve-se o sal hidrocloreto do composto puro como um sólido branco (rendimento de 71%). <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O), δ (ppm): 8.08 – 8.03 (2d, 2H, 4,7-BTAH), 7.61 (t, *J* = 7.5 Hz, <sup>1</sup>H, BTAH), 7.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, 5-BTAH), 3.58 (s, 4H, 6-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); m/z (ESI MS): 179.1 (M + H)<sup>+</sup>.

#### 3.3.2.3. (S)-1-benzotiazol-2-il)etanamina (3a)

Seguiu-se a mesma estratégia de síntese em relação ao **1a**, usando neste caso o aminoácido L-alanina. Os passos de purificação dos produtos obtidos foram semelhantes aos aplicados nos outros casos. Obteve-se um sólido cor-de-rosa

(rendimento de 94%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 8.03 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, 4,7-BTA $\text{H}$ ), 7.59 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 5-BTA $\text{H}$ ), 7.51 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 6-BTA $\text{H}$ ), 5.02 (q,  $J = 6$  Hz, 1H, CHNH), 1.82 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H, CH $_3$ );  $m/z$  (ESI MS): 179.1 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ .

#### 3.3.2.4. (R)-1-(Benzotiazol-2-il)etanamina (4a)

Seguiu-se a mesma estratégia de síntese em relação ao **1a**, usando como reagente a D-alanina. Purificou-se o produto obtido seguindo os mesmos passos atrás detalhados, obtendo-se o sal hidrolórico do composto pretendido como produto puro (rendimento de 41%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 8.08 (m, 2H, 4,7-BTA $\text{H}$ ), 7.56 (m, 2H, 5,6-BTA $\text{H}$ ), 4.72 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, CHNH $_2$ ), 2.48 (m, 1H, CH(CH $_3$ ) $_2$ ), 1.14 (d,  $J = 6$  Hz, 3H, CH $_3$ ), 1.0 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H, CH $_3$ );  $m/z$  (ESI MS): 179.1 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ .

#### 3.3.2.5. (S)-1-(Benzotiazol-2-il)-2-metilpropano-1-amina (5a)

Continuando com a mesma estratégia de síntese até agora seguida, sintetizou-se o derivado BTA da D-valina. Procedeu-se da mesma forma no que toca à purificação do produto obtido. Obteve-se um sólido rosa claro (rendimento 86%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 8.0 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, 4,7-BTA $\text{H}$ ), 7.50 (m, 2H, 5,6-BTA $\text{H}$ ), 4.66 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CHNH), 2.41 (m, 1H, CH(CH $_3$ ) $_2$ ), 1.08 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H, CH $_3$ ), 0.92 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H, CH $_3$ );  $m/z$  (ESI MS): 207.1 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ .

#### 3.3.2.6. 4-(Benzotiazol-2-ilmetil)anilina (6a)

A mesma estratégia de síntese foi seguida para a síntese de **6a**, partindo neste caso do ácido 4-aminofenilacético (APA). Procedeu-se da mesma forma que para o **1a**, obtendo-se o produto puro como o sal hidrolórico do composto pretendido (rendimento 53%).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 7.98 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, Ar $\text{H}$ ), 7.93 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, Ar $\text{H}$ ), 7.56 (d,  $J = 9$  Hz, 2H, ArHNH $_2$ ), 7.50 (d,  $J = 9$  Hz, 2H, Ar $\text{H}$ ), 7.42 (d,  $J = 9$  Hz, 2H, ArHNH $_2$ ), 4.57 (s, 2H, CH $_2$ );  $m/z$  (ESI MS): 241.1 ( $\text{M} + \text{H}$ ) $^+$ .

### 3.3.3. Síntese dos compostos alvo (1-9)

#### 3.3.3.1. (E)-N-(benzo[d]tiazol-2-il-metil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (1)

À uma solução de **1a** (0.158 g, 0.962 mmol) em THF seco (25 mL), sobre gelo e sob atmosfera de N<sub>2</sub>, adicionou-se uma solução de *N*-metilmorfolina seca, *NMM* (300 µL, 2.44 mmol) também em THF seco. Esta mistura foi deixada a reagir durante 30 min, a 0°C sob N<sub>2</sub>, obtendo-se a amina activada e o precipitado de cloreto de *N*-metilmorfolínio. Entretanto, uma solução de ácido 3,4-dimetoxicinâmico (ADMC, 201 mg, 0.96 mmol), na presença do agente de acoplamento *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronium tetrafluoroborato (TBTU, 340 mg, 1.06 mmol), e de *NMM* (250 µL, 2.13 mmol), em THF seco (25 mL), foi agitada durante 30 min a 0 °C, sob N<sub>2</sub>. Esta solução foi adicionada lentamente à primeira, e a mistura resultante foi deixada a reagir durante 2 h, a 0°C sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Seguiu-se a reacção através da cromatografia em camada fina (TLC). Filtrou-se o precipitado de *N*-metilmorfolínio e evaporou-se o solvente da mistura reaccional. Obteve-se um óleo amarelado/acastanhado que foi subsequentemente dissolvido em acetato de etilo (40 mL). Lavou-se a mistura com uma solução aquosa de NaOH 5% (4 × 10 mL) de modo a retirar o ADCMC por reagir, e de seguida com HCl 0.1 M (3 × 10 mL) para retirar o reagente **1** remanescente. Secou-se a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, durante 30 min. Filtrou-se o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e evaporou-se o solvente, obtendo-se o produto puro em forma oleosa amarelado. Este foi recristalizado com éter etílico, obtendo-se o produto puro sob a forma de um sólido branco (205 mg, rendimento 60.2%). P.f. 159-161°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.00 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, 4-BTAH), 7.87 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H, 7-BTAH), 7.76 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH=CHPh), 7.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, 5-BTAH), 7.4 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, 6-BTAH), 7.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, 6-PhH), 7.06 (s, 1H, 2-PhH), 6.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, 5-PhH), 6.54 (t, *J* = 4.5 Hz 1H, NH), 6.39 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, CH=CHPh), 5.01 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, BTA-CH<sub>2</sub>), 3.92 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>); m/z (ESI MS): 377.1 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### 3.3.3.2. (E)-N-(2-benzo[d]tiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (2)

Um procedimento idêntico à síntese de **1** foi seguido para a preparação do **2**, partindo neste caso de **2a** para acoplar ao ADCMC. Seguiram-se os mesmos passos de purificação anteriores, obtendo-se um sólido branco como produto puro (rendimento 49.1%). P.f. 138-139°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.04 (d, *J* = 8.1, 1H, 4-BTAH), 7.89 (d, *J* = 7.6



Hz, 1H, 7-BTAH), 7.59 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CH=CHPh), 7.52 (t,  $J = 7.1$ , 1H, 5-BTAH), 7.42 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 6-BTAH), 7.11 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 6-PhH), 7.04 (s, 1H, 2-PhH), 6.86 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 5-PhH), 6.47 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, NH), 6.28 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CH=CHPh); 3.98 (qd,  $J = 5.7$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); 3.92 (s, 6H, 2 × OCH<sub>3</sub>), 3.42 (t,  $J = 5.9$  Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); m/z (ESI MS): 391.3 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### 3.3.3.3. (S,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (3)

Uma solução de ADMC (100 mg, 0.48 mmol), hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 138 mg, 0.55 mmol) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 5 mg, 48 μmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (50 mL), foi agitada a 0 °C, em atmosfera de N<sub>2</sub>, durante 30 min. Esta solução foi então adicionada a uma solução de **3a** (133 mg, 0.48 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) e deixou-se a mistura resultante a reagir durante a noite. Evaporou-se o solvente e dissolveu-se o óleo obtido em acetato de etilo. Esta mistura foi lavada com água destilada (3 × 20 mL) e seguidamente com uma solução aquosa de NaOH 5% (4 × 15 mL) de forma a retirar o ADMC que ficou por reagir. Lavou-se a fase orgânica com HCl 0.1 M (4 × 15 mL). Esta foi posteriormente seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo a 40 °C. Obteve-se um sólido branco como produto puro (rendimento 94.8%). P.f. 155-157 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.02 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, 4-BTAH), 7.87 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, 7-BTAH), 7.64 (d,  $J = 11.6$  Hz, CH=CHPh), 7.48 (t,  $J = 6.15$  Hz, 1H, 5-BTAH), 7.42 (t,  $J = 6$  Hz, 1H, 6-BTAH), 7.11 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H, 6-PhH), 7.04 (s, 1H, 2-PhH), 6.86 (d,  $J = 6.2$  Hz, 1H, 5-PhH), 6.78 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, NH), 6.41 (d,  $J = 11.7$  Hz, 1H, CH=CHPh), 5.67 (qt,  $J = 5.4$  Hz, 1H, BTA-CH), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.77 (d,  $J = 5.2$  Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); m/z (ESI MS): 391.1 (M+Na)<sup>+</sup>.

#### 3.3.3.4. (R,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(3,4-dimetoxifenil)acrilamida (4)

Um procedimento idêntico ao **3** foi seguido para a síntese de **4**, partindo de **4a**. Seguiram-se os mesmos passos de purificação, obtendo-se um sólido branco como produto puro (rendimento 93.2%). P.f. 153-155 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.02 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, 4-BTH), 7.88 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 7-BTAH), 7.65 (d,  $J = 15.5$  Hz, CH=CHPh), 7.51 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 5-BTAH), 7.40 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 6-BTAH), 7.12 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 6-PhH), 7.06 (s, 1H, 2-PhH), 6.88 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 5-PhH), 6.64

(d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, **NH**), 6.40 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, **CH=CHPh**), 5.67 (qt,  $J = 7.2$ , Hz, 1H, **BTA-CH**), 3.93 (s, 6H, **OCH<sub>3</sub>**), 3.89 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**), 1.77 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, **CHCH<sub>3</sub>**); m/z (ESI MS): 391.2 (M+Na)<sup>+</sup>.

### 3.3.3.5. (R,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)-2-metilpropil)-3-(3,4-dimetoxifenil) acrilamida (**5**)

Um procedimento idêntico à síntese de **3** foi seguido para o **5**, partindo de **5a**. Obteve-se o produto como um sólido branco (rendimento 87.9%). P.f. 73-75 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.92 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, 4-BTA**H**), 7.78 (d,  $J = 7.8$ , 1H, 7-BTA**H**), 7.54 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, **CH=CHPh**), 7.39 (t,  $J = 7.7$  Hz, 1H, 5-BTA**H**), 7.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 6-BTA**H**), 6.98 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 6-Ph**H**), 6.93 (s, 1H, 2-Ph**H**), 6.82 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, **NH**), 6.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, 5-Ph**H**), 6.38 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, **CHCHPh**), 5.41 (t, 1H,  $J = 7.4$  Hz, 1H, BTACH**H**), 3.81 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**), 3.78 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**), 2.45-2.36 (m, 1H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**), 0.96 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6 H, **CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**); m/z (ESI MS): 397.2 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3.3.3.6. (E)-N-(4-(benzotiazol-2-il-metil)fenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-acrilamida (**6**)

Procedeu-se para a síntese de **6** de igual forma que no caso do **3**, partindo de **6a**. Seguiram-se os mesmos passos de purificação anteriormente descritos e obteve-se um sólido amarelo com produto puro (rendimento 33.8%). P.f. 210-211 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.02 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 4-BTA**H**), 7.82 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H, 7-BTA**H**), 7.72 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H, **CH=CHPh**), 7.62 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, APA**H**), 7.48 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H, 5-BTA**H**), 7.39-7.34 (m, 3H, 6-BTA**H**; APA**H**), 7.16 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 6-Ph**H**), 7.08 (s, 1H, 2-Ph**H**), 6.90 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, 5-Ph**H**), 6.42 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H, **CH=CHPh**), 4.44 (s, 2H, BTACH<sub>2</sub>Ph), 3.94 (s, 6H, 2 × **OCH<sub>3</sub>**); m/z (ESI MS): 439.2 (M+Na)<sup>+</sup>.

### 3.3.3.7. (E)-N-(2-benzotiazol-2-il)etil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (7)

Na síntese de **7**, usou-se como reagente o ácido ferúlico em vez do ácido dimetoxicinâmico e TBTU como agente de acoplamento (como descrito na estratégia de síntese). Partiu-se do ácido ferúlico (100 mg, 0.514 mmol), em dimetilformamida seca, DMF (50 mL) ao qual adicionou-se TBTU (198 mg, 0.62 mmol), e *N*-metilmorfolina, *NMM* (150  $\mu$ l, 1.23 mmol). Esta mistura foi deixada a reagir durante 40 min, a 0 °C e sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Procedeu-se à desprotonação do sal hidrolórico do derivado **2a** (133 mg, 0.62 mmol) através da adição de *NMM* ((150  $\mu$ l, 1.23 mmol) em DMF seco (30 mL). Deixou-se a 0 °C e sob N<sub>2</sub> durante 30 minutos, obtendo-se a forma desprotonada de **2a**, bem como a formação de cloreto de *N*-metilmorfolínio como um precipitado branco. Adicionou-se lentamente a segunda mistura à primeira, deixando a resultante reagir sobre gelo e sob N<sub>2</sub> durante a noite. Aquando da extração do produto final, adicionou-se acetato de etilo à mistura reaccional. Seguidamente, lavou-se com água destilada (4  $\times$  20 mL) como o objectivo de retirar o solvente, DMF. Lavou-se a fase orgânica com soluções aquosas de NaOH 5% (4  $\times$  20 mL) e HCl 0.1 M (4  $\times$  20 mL), com o objectivo de retirar **2a** e ácido ferúlico por reagir, respectivamente. Secou-se com N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e evaporou-se o solvente sob vácuo a 40 °C. Obteve-se um sólido branco como produto puro (145.5 mg, rendimento 69.3%). P.f: 163-165°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 4-BTAH), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, 7-BTAH), 7.54 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CH=CHPh), 7.49 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H, 5-BTAH), 7.39 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, 6-BTAH), 7.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 6-PhH), 6.99 (s, 1H, 2-PhH), 6.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 5-PhH), 6.43 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, NH), 6.24 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, CH=CH), 3.95 (qd, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.38 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH); m/z (ESI MS): 355.2 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3.3.3.8. (S,E)-N-(1-benzotiazol-2-il)etil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (8)

Procedeu-se de forma semelhante à síntese de **7**, partindo de **3a**. Seguiu-se os mesmos passos de síntese e purificação descritos em **7**. Obteve-se um sólido branco como produto puro (rendimento 78.9%). P.f. 161-163 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.00 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 4-BTAH), 7.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 7-BTAH), 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, CH=CHPh), 7.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 6-BTAH), 7.39 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, 5-BTAH),

7.08 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 6-Ph $H$ ), 7.02 (s, 1H, 2-Ph $H$ ), 6.91 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, 5-Ph $H$ ), 6.63 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, NH), 6.36 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, CHCHPh), 5.64 (qt,  $J = 7.2$  Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.75 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>); m/z (ESI MS): 355.2 (M+H)<sup>+</sup>.

### 3.3.3.9. (E)-N-(4-benzotiazol-2-il-metil)fenil)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acrilamida (9)

Um procedimento idêntico ao da síntese de **7** foi seguido para **8**. Partiu-se de **6a** (256.6 mg, 0.93 mmol), em DMF (25 mL) e adicionou-se NMM (110 µL, 1.12 mmol). Preparou-se a segunda mistura reaccional como descrito em **7**, partindo de 150 mg de ácido ferúlico (0.772 mmol) em DMF (50 mL). Adicionou-se TBTU (297.6 mg, 1.12 mmol) e NMM (220 µL, 2.24 mmol). Seguiram-se os mesmos passos de síntese e purificação descritos em **7**. Obteve-se um sólido amarelo como produto puro (rendimento 50.2%). P.f: 83-85 °C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 8.00 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, 4-BTAH), 7.79 (d,  $J = 5.9$  Hz, 1H, 7-BTAH), 7.67 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H, CH=CHPh), 7.60 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H, APAH), 7.45 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H, 5-BTAH), 7.36-7.32 (m, 3H, 6-BTAH; APAH), 7.10 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, 6-PhH), 7.02 (s, 1H, 2-PhH), 6.92 (d,  $J = 6.1$  Hz, 1H, 5-PhH), 6.39 (d,  $J = 11.5$  Hz, 1H, CH=CHPh), 4.42 (s, 2H, BTACH<sub>2</sub>Ph), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); m/z (ESI MS): 437.2 (M+Na)<sup>+</sup>.

## 3.4. Ensaio de inibição enzimática

Procedeu-se à determinação da capacidade inibitória dos compostos preparados, em relação ao AChE, através do método de Elman *et al.*,<sup>86</sup>. O tampão usado nos ensaios enzimáticos foi o ácido (4-2-hidroxietil) -1-piperazina etanasulfónico (HEPES) 50 mM, a pH 8. O reagente de Ellman (ácido ditiobis- (2-nitrobenzoico) DTNB (3.1 mM) foi dissolvido em HEPES 50 mM, pH 8, NaCl (21 mM), MgCl<sub>2</sub> (50 mM). O substrato da enzima usado no ensaio foi o iodeto de acetilcolina, AChI (16 mM, solução stock). Antes do ensaio diluiu-se a solução de AChI 15 vezes, para uma concentração final de 1.1 mM. O AChE (36.1 U/mL) extraído de *electrophorus electricus* foi adquirido à Sigma-Adrich e diluído em tampão HEPES 50 mM pH 8. Foi preparado um alíquota da enzima diluindo 20 vezes o stock inicial e conservado no congelador. Esta solução de

enzima foi preparada diariamente e apresentava uma concentração cuja actividade se centrava entre os 0.08 e os 0.1  $\Delta\text{Absmin}^{-1}$

Preparou-se quatro concentrações diferentes de inibidor, dissolvidos em metanol (MeOH), que apresentavam actividades inibitórias entre os 10 e os 90%. O ensaio final na cuvette consistiu em 375  $\mu\text{l}$  de tampão HEPES 50 mM pH 8, 475  $\mu\text{l}$  de DTNB (3.1 mM), 75  $\mu\text{L}$  de iodeto de acetilcolina (1.1 mM), 25  $\mu\text{l}$  de AChE (1.805 U/mL) e de 50  $\mu\text{L}$  da solução de inibidor em metanol. O volume final do ensaio na cuvette foi de 1 mL. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente, com o enzima durante 15 min, antes da adição do substrato. Depois, fez-se a leitura das velocidades iniciais através de um espectrofotómetro Campsec M350 Double Beam UV-Visible à 405 nm, durante 4 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicado e preparou-se como branco uma cuvette com todos os reagentes à excepção do enzima, AChE. A percentagem de inibição dada a presença do inibidor foi calculada através da seguinte expressão:

$$100 - \frac{v_i}{v_o} \times 100$$

em que  $v_i$  é a velocidade de catálise na presença de inibidor e  $v_o$  é a velocidade de catálise na ausência de inibidor. As curvas de inibição foram obtidas através da relação; percentagem de inibição enzimática versus concentração de inibidor. Traçou-se então uma recta e obtiveram-se os parâmetros de regressão linear utilizados para o cálculo do IC50. O programa usado para as regressões lineares foi o Excel do Microsoft Office 2010.

### 3.5. Estudo da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante, dos compostos desenvolvidos, foi avaliada seguindo um protocolo experimental baseado no método do 2,2-difenilpicrilhidrazil ( $\text{DPPH}^\cdot$ ). Assim, a capacidade de doação de um átomo de hidrogénio por parte dos compostos foi medida através da extinção da cor violeta de uma solução do radical estável ( $\text{DPPH}^\cdot$ ) em metanol. Este ensaio consiste no uso do radical como reagente a medida que se segue a diminuição da absorvência a  $\lambda$  igual a 517 nm. Preparou-se uma solução de DPPH (50  $\mu\text{M}$ ) em metanol, que apresenta absorvência 517 nm ( $\text{Abs}_{517\text{nm}}$ ) entre 0.6 e os 0.7 (condições ideais para os ensaios). De referir que esta solução foi preparada diariamente. Os compostos em estudo foram dissolvidos em metanol. Para os ensaios

foram preparadas 4 soluções de inibidor à concentrações distintas. Adicionou-se 50 µL do inibidor à solução de DPPH (2.5 mL) e incubou-se durante 30 min. Leu-se a absorvência ao pico de absorção máxima do radical estável do DPPH, à 517 nm, através de um espectrofotómetro Campsec M350 Double Beam UV-Visible. Realizou-se um ensaio controlo em que se adicionou todos os reagentes à cuvette, à excepção da solução de DPPH, que foi substituída por MeOH. A extinção do radical DPPH<sup>•</sup> foi calculada em percentagem (%) através da seguinte expressão:

$$Ext (\%) = \left( 1 - \frac{A_{Amostra}}{A_{Branco}} \right) \times 100$$

Onde A<sub>Branco</sub> é a absorvência do branco ou controlo (contém todos os reagentes à excepção do composto a testar), A<sub>Amostra</sub> é a absorvência da solução de DPPH na presença do inibidor. Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados através do gráfico; concentração de inibidor (em µM) versus percentagem de extinção do radical do DPPH. Todos os ensaios foram feitos em triplicado, permitindo calcular os respectivos desvios padrão. O programa usado para calcular os valores de EC<sub>50</sub>, através de regressões lineares, foi o Excel do Microsoft Office 2010.

## Bibliografia

1. Maria L. Bolognesi, R.M., Ana Marinani, Michela Rosini and Carlo Melchiorre, Alzheimer 's disease: New approaches to drug discovery, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2009**, 13, 303- 308
2. Michela Rosini, E.S., Manuela Bartolini, Andrea Cavali, Luisa Ceccarini, Nicoleta Pascu, Dadiv W. Bolognesi, Ana Minarini, Vincenzo Tumiatti, Vincenza Andrisano, Ian R. Mello rand Carlos Melchiorre, Inhibition of Acetylcholinesterase, B-amyloid Agregation and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease: A promising Direction for the multi-target-direced Gold Ruch. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51, 4381-4384
3. Andrea Cavali, M.B., Ana Minarini, Michela Rosini, Vinzenzo Tumiatti, Maurizio Recanatini and Carlo Melchiorre, Multi-Target-Directed Ligands to combat Neurodegenerative Diseases, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51(3), 347-371.
4. Jelliger, K.A., General aspects of neurodegeneration. *Journal of Neuronal Transmission*, **2003**, 101-144
5. Zeevalk, G.D.B.,L.P.; Song C.; Gluck, M;Ehrhart, J., Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration, *Antioxid. Redox signaling*, **2005**, 7, 1117-1139
6. Wang, J.Y.W., L.L.,Huang, Y. N., Chen, Y. T., Ku, M. C., Dual effects of antioxidants in neurodegeneration; direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of gli-mediated inflammation, *Cur Pharm. Des.*, **2006**, 12.
7. Raja Rezg, B.M. Solua El Fazza, Nagjoua Ghardbi, Caffeic acid attenuates melathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity, *Toxicology*, **2008**, 250,27-31
8. Coppede, F. M., Siciliano, G., Megliore, L., Murri, L., Genes and the environment in neurodegeneration. *Biosci. Rep.*, **2006**, 26,341-367

9. Dong, H., et al. Effects of donepezil on amyloid-beta at synapse density in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, *Brain Res.*, **2009**, 1303, 169-78
10. Cummings, J. L., Cholinesterase inhibitors: A new Class of psychotropic Compounds. *American Journal of Psychiatry*, **2000**, 157:1
11. Danial, N.N.K., S. J., Cell death: critical control points, *Cell*, **2004**, 116. 205-219
12. Mi, K.J., G.V., The role of *tau* phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, 3, 449-463
13. Ho, L., et al., Alzheimer's disease biomarker discovery in symptomatic and asymptomatic patients: experimental approaches and future clinical applications. *Exp Gerontol*, 45, 1, 15-22
14. Weller, R. O., et al., Cerebral amyloid angiopathy in the etiology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther*, **2009**, 1(2), p-6
15. Sierksma, A. S., et al., Major depression, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease: is there a link? *Eur J Pharmacol.*, 626, 72-82
16. Hay Dvir, I.S., Michal Harel, Terrone L. Rosenberry, Joel L. Sussman, Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, **2010**
17. Ciaran G. Carolan, G.P.D., Denise Khan, Sheila A. Ryder, Joane M. Gaynor, Sean Reidy, JuanF. Marquez, Mike Jones, Valerie Holland and John F. Gilmer, Isosorbide-2—benzyl Carbamate-5-salicylate, A peripheral anionic site binding subnanomolar selective butyrylcholinesterase Inhibitor, *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 53, 1190-1199
18. Michal Harel, G. K., Terrone L. Rosenberry, William D. Mallender, Terence Lewis, Rodney J. Fletcher, J. Mitchell Guss, Israel Silman and Joel L. Sussman, Three-dimensional structures of *Drosophila Melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science*, **2000**, 9, 1063-1072
19. J. Šebestík, S.M. Marques, P.L. Falé, S. Santos, D.M. Arduíno, S.M. Cardoso, C.R. Oliveira, M.L.M. Serralheiro, M.A. Santos; Bifunctional phenolic-choline conjugates as



anti-oxidants and acetylcholinesterase inhibitors; *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2011**, 26, 485-497.

20. Manuela Bartolini, C.B., Vanni Cavrini, Vincenza Adrisano,  $\beta$ -amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies, *Biochemical Pharmacology*, **2003**, 65, 407-416

21. Runa S. Naik, J. H., Cornelia Kiewert, Ellen G. Duysen, Oksana Lockridge and Jochen Klein, Effects of Rivastigmine and Donepezil on brain acetylcholine levels in Acetylcholinesterase. deficient mice, *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2009**, 12, 79-85

22. Talma Brenner, E. N. Michal Irnoy-Tur-Sinai, Yasmine Hamra-Amitay, Itzhak Wirguin, Acetylcholinesterase Inhibitors and cholinergic modulation in Myasthenia Gravis and neuroinflammation , *Journal of Neuroinflammation*, **2008**, 201-202, 121-127

23. Carlos Morgana, M.C., Marco Tulio Nunez, Nibaldo C. Inestrosa, Structure and function of amyloid in Alzheimer's Disease, *Progress in Neurobiology*, **2004**, 74, 323-349

24. Campion et a., Early-onset autosomal dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic, Heterogeneity and mutation Spectrum, *The American Journal of Human Genetics*, **1999**, 65, 664-670

25. Ebrahim Barzegari Asadabadi, P.A., Syed Mohsen, Hosseini Barkooie, Samad Jahandideh, Mohamed Ali Rezaei, A combinatorial feature selection approach to describe the QSAR of dual site inhibitors of Acetylcholinesterase, *Computers in Biology and Medicine*, **2009**, 39, 1089-1095

26. P. Bar-On, C.B.M., M. Harel, H. Dvir, A.Enz, J. L. Sussman and I.Silman, Kinetic and Structural Studies on the interaction of Cholinesterase with the anti-Alzheimer drug rivastigmine, *Biochemistry*, **2002**, 41, 3555-3564

27. Ulrika Warpmana et al., Coupling of muscarinic receptors to GTP proteins in postmortem human brain – alterations in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, **1993**, 150, 39-43

28. Prince, D.A.M.A.D.A., Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, 82, 6344-6348
29. Mimica, N., S. Drmic and P. Presecki, Involuntary emotional expression disorder in Alzheimer's disease – psychopharmacotherapy aspects, *Psychiatr Danub*, **2009**, 21(3), 425-8
30. RT Bartus, R.D.R., b. Beer and AS Lippa, The Cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, **1982**, 217, 408-414
31. Krebs JR, E. J., Bingman VP., The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon, *J. Comp Neurol.*, **1991**, 314, 467-477
32. Rylett RJ, B. M., Colhoun EH., Evidence for high affinity choline transport in the synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's Disease. *Brain Res.*, **1983**, 289, 169-175
33. A. V. Terry, J.A. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-Related Cognitive deficits: Recent Challenges and their implications for novel drug development, **2003**, 821-827
34. Liskowky W, S.R.L., Muscarinic acetylcholine receptor inhibition in transgenic Alzheimer-like Tg2576 mice by scopolamine favours the amyloidogenic route of processing of amyloid precursor protein, *Int J Dev Neurosci.*, **2006**, 24, 149-156
35. Hock C. K.U., Streffer Jr, Tracy J, Signorell A, Muller-Tillmanns B, Lemke U, Henke K, Moritz E, Garcia E, Wollmer MA, Umbricht D, de Quervain DJ, Hofmann m, Maddalena A, Papassotiropoulos A, Nitsch RM., Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease, *Neurobiology*, **2003**, 38, 547-554
36. Kohoe, P.G., S. Miners and S. Love, Angiotensins in Alzheimer's disease – friend or foe? *Trends Neurosci*, **2009**, 32, 619-28
37. Toshihiko Oguraa, K.M.Ikuo Hayashic, Hiroyuki Miyashitac, Rie Fukudad, Raphael Kopane, tatsuhiko Kodamad, Takao Hamakubod, Takeshi Iwastubo, Taisuke Tomitac and Chikara Satoa, Three-dimensional structure of the  $\gamma$ -secretase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2006**, 346, 525-534.

38. W. Taylor Kimberly, M.J.L., Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, Michael S. Wolfe and Dennis J. Selkoe,  $\gamma$ -secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1 and pen-2, *Biochemistry*, **2002**, 100, 6382-6387.
39. Cavalli, A. Bolognesi, M. L., Capsoni, S., Adrisano, V., Bartolini, M., Margotti, E., Cattaneo, A., Recanatini, M., Melchiorre, C., A small molecule targeting the multifactorial nature of Alzheimer's disease, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3689-3692
40. Shohreh Majda, K.R., Asadollah Zarifkara and Mohammad Ali Takhshid, Fibrillar beta-amyloid (Ab1-42) elevates extracellular Ab in cultured hippocampal neurons of adult rats, *Brain research*, **2007**, 1185, 321-327
41. Edward H Koo, R. K., Potential role of presenilin regulated signaling pathways in sporadic neurodegeneration, *Nature Medicine*, **2004**, 10, S26-S33
42. Selkoe, D.J., Alzheimer's disease is a synaptic Failure. *Science*, 2002, 289, 789-791
43. J. Jakubik, P.M., E. Machová, V. Dolezal, Importance and prospects for design of Selective muscarinic agonists, *Physiol. Res.*, **2008**, 57, S39-S47
44. Tripier, P.C., Labby K. J., Hawker, D. D., Silverman, R.B., Target and mechanism based therapeutics for neurodegenerative diseases: Strength in numbers, *J Med. Chem.*, **2013**, 56, 3121-3147
45. Goedert M, C.R., Garner CC., Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2, *Trends Neuroscience*, **1991**, 14, 193-199
46. Lew, G. M., Tau protein after delta-9-tetrahydrocannabinol in human neuroblastoma cell line, *General Pharmacology: The Vascular System*, **1996**, 27, 1141-1143
47. Mandelkow, Y. H. S., O. Schweers, A. Marx and E. M. Mandelkow, On the structure of microtubules, tau, and paired helical filaments. *Neurobiology of Aging*, **1995**, 16, 347-354
48. Goeder, M., Alzheimer's disease: Pinning down phosphorylated tau, *Nature*, **1999**, 399, 739-740

49. Luc Buée, A.D., Comparative Biochemistry of tau in progressive supranuclear palsy, Corticobasal Degeneration, FTDP-17 and Pick's Disease, *Brain Pathology*, **2006**, 9, 681-693
50. Jochen Eidenmuller, T.F., Andrea Hellwig, Jennifer Reed, Estelle Sontag and Roland Brandt, Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: Information from phosphorylation-Mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry*, **2000**, 39, 13166-13175
51. Hamley, I.w., The amyloid beta peptide: A chemist's Perspective: Role in Alzheimer's disease and fibrillization, *Chem. Rev.*, **2012**, 112, 5147-5192
52. Giacobini, E., Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, **2003**, 18, S1-S5
53. Frank S, C.F., Tolnay M., Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, **2008**, 115, 39-53
54. Inestrosa NC, D. M., Alvarez A., Amyloid.cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. *Federation of European Biochemical Societies*, **2008**, 275, 625-632
55. S. Blumberg, I.S., Inactivation of electric eel acetylcholinesterase by acylation with N-hydroxysuccinamide esters of amino acid derivatives. *Biochemistry*, **1978**, 17, 1125-1130
56. Lochridge, O., Structure of human serum cholinesterase. *BioEssays*, **1988**, 9, 125-128
57. Masahito Ono, S. H., Hiroyuki Kimura, Hidekazu Kawashima, Morio Nakayama, Hideo Saji, Push-pull benzotiazole derivatives as probes for detecting  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 7002-7007
58. Massoulié J. P. N., Noureddine H, Liang D, Bon S., Old and new questions about cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, 175, 30-44
59. F.K.Winkler, A.D.A.W.H., Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, **1990**, 343, 771-774

60. Sohail Saeed, N.R., Peter G. Jones, Muhammad Ali, Rizwan Hussain, Synthesis, Characterization and biological evaluation of some thiourea derivatives bearing benzothiazole moiety as potential antimicrobial and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 1-9
61. Jacques- Philippe Colletier, D. F., Harry M Greenblatt, Jure Stojan, Joel L. Sussman, Giuseppe Zaccai, Israel Silman and Martin Weik, Structural Insights into substrate traffic and inhibition of acetylcholinesterase. *European Molecular Biology Organization*, **2006**, 25, 2746-2756
62. Wilkinson, D. et al., Effectiveness of donepezil in reducing clinical worsening in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **2009**, 28, 244-51
63. Kenneth L. Wiley, Jose R. Tormos, Daniel M. Quinn, A Secondary Isotope Effect Study of Equine Serum Butyrylcholinesterase-Catalyzed Hydrolysis of Acetylthiocholine, *Chem Biol Interactions*, **2010**, 187, 124-127
64. Joseph D. Schrag, Y. L. Shan Wu and Mirosław Cygle, Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum Candidum*. *Nature*, **1991**, 761-764
65. Szegletes T, M.W., Thomas PJ, Rosenberry TL., Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry*, **1999**, 38, 122-133
66. Yanzi Zhou, S. W., and Yangkai Zhang, Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer Ab Initio QM/MM molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem.*
67. Benedict C.F.W., Schioth HB, Schultes B, Born J, Hallshmid M., Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Exp Gerontol.*, **2010**, 16
68. Davis KL, T. L., Gamzu ER, Davis CS, Woolson RF, Gracon SI, Drachman DA, Schneider LS, Whitehouse PJ, Hoover TM, A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrina for Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, **1992**, 327, 1253-1259

69. Farlow M. G.S., Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J., A controlled trial of tacrina in Alzheimer's disease, The tacrina study Group, *JAMA*, **1992**, 268, 2523-2529
70. Mohs R, D.R., Morris J., Leni J. Perdomo C., Pratt R et al., Donepezil preserves activities of daily living in Alzheimer's disease patients: Results from a one-year placebo-controlled functional survival study, *Neurology*, **2000**, 54
71. Giancarlo V. De Ferrari, M.A.C., Irina Shin, Lev M. Wiener, Israel Silman and Nibaldo C. Inestrosa, A structural motif of Acetylcholinesterase that promotes amyloid  $\beta$ -amyloid fibril formation. *Biochemistry*, **2001**, 40, 10447-10457
72. Rogers SL, D.R., Mohs RC, Fridhoff LT., Donepezil improves cognition and global function in Alzheimer's disease: a 15-week, double-blind, placebo-controlled study. Donepezil Study Group, *Arch Intern Med.*, **1998**, 158, 1021-1031
73. Corey-Bloom, J.A., R. Veatch, J, A randomized trial evaluating the efficacy and safety of ENA 713 (rivastigmine tartrate), a new acetylcholinesterase inhibitor, in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease, *Psychopharmacol*, **1998**, 1, 55-65
74. Cummings JL, C.P., Bieber F. Mas J, Orazem J, Gulanski B., Metrifonate treatment of the cognitive deficits of Alzheimer's disease. Metrifonate Study Group, *Neurology*, **1998**, 50, 1214-1221
75. Eagger SA, H.R., Clinical heterogeneity: Responders to cholinergic therapy. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 1995, 9, 37-42
76. Akio Sato, Y.S.A.S.U, Activation of the intracerebral cholinergic nerve fibers originating in the basal forebrain increases regional cerebral blood flow in the rat's cortex and hippocampus\*1, *Neuroscience Letters*, **2003**, 361, 90-93
77. Paul S. Aisen, M., Lon S. Schneider, Mary Sano, Ramon Diaz-Arrastia, Christopher H. Van Dyck, Myron F. Weiner, Teodoro Bottiglieri et al., High dose B vitamin supplementation and cognitive decline in Alzheimer's disease: A randomized Controlled trial. *JAMA*, **2008**, 300, 1774-1783

78. Davies P, M.A., Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lanet*, **1976**, 308, 1403
79. Andersen, J. K., Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence. *Nature Medicinal*, **2004**, 10, 18-25
80. Daniela Galimberti, E.S., Genetics and biology of Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration, *Int J Clin Exp Med*, **2010**, 3, 129-143
81. Macromodel, version 8.5; Schrödinger Inc.: Portland, OR, **1999**
82. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**; 267: 727-748.
83. QikProp, version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2005**.
84. Di L., Kerns E.H., Carter G.T. Strategies to assess blood–brain barrier penetration. *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**; 3: 677-687.
85. Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals, 4th ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, **1999**
86. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Anders Jr., V., Featherstone, A new and rapid calorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, **1961**, 7, 88-98
87. J. Šebestík, S.M. Marques, P.L. Falé, S. Santos, D.M. Arduíno, S.M. Cardoso, C.R. Oliveira, M.L.M. Serralheiro, M.A. Santos; Bifunctional phenolic-choline conjugates as anti-oxidants and acetylcholinesterase inhibitors; *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2011**, 26, 485-497.